

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Genética del bacteriófago O29

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rafael Pérez Mellado

DIRECTOR:

Margarita Salas

Madrid, 2015

5330828766

RSEHN-247
N
4510



GENETICA DEL BACTERIOFAGO Ø 29

Tesis presentada para optar al
grado de DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS por el licenciado
Rafael Perez Mellado.

Madrid, Julio de 1.976

Este trabajo, que se presenta como Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Biología del Desarrollo bajo la dirección de la Dra. Margarita Salas.

Deseo expresar mi agradecimiento tanto a mi director de Tesis como al Dr. Eladio Viñuela por su interés, ayuda y orientación prestada en la realización del trabajo y en mi formación en el campo de la investigación científica.

Quiero hacer constar igualmente mi agradecimiento al Dr. J.L. Carrascosa, a F. Jiménez, al Dr. F. Moreno y a las Dras. A. Camacho y M.R. Inciarte por su ayuda material y a todos mis compañeros por su estímulo y valiosas sugerencias.

De igual modo, quiero agradecer a P. Zaragoza, E. Cano, N. Fontúrbel, J. de la Torre, J.M. Lázaro y J. López su colaboración técnica y a M. Corral y L. Moore su ayuda en la preparación de esta Tesis.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca para la formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABREVIATURAS

DNA: ácido deoxirribonucleíco
RNA: ácido ribonucleíco
mRNA: ácido ribonucleíco mensajero
tRNA: ácido ribonucleíco de transferencia
DNasa: deoxirribonucleasa
RNasa: ribonucleasa
SDS: dodecilsulfato sódico
Tris: trihidroximetil aminometano
EDTA: etilen diamino tetraacetato
SSC: solución salina-citrato (cloruro sódico
0.15 M - citrato sódico 0.015 M)
Butil-PBD: 2-(4'-tercbutilfenil)-5-(4"-difenilil)-
1.3.4-oxadiazol
PPO: 2,5-difeniloxazol
dimetilPOPOP: 1,4-bis 2(-metil-5-fenil-oxazolil)
benceno
DF: diluyente de fago
sus: sensible a supresor
ts: sensible a temperatura
ufp: unidades formadoras de placa
mdi: multiplicidad de infección

rpm: revoluciones por minuto

EMS: etilmetano sulfonato

NG: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitro-
soguanidina)

NA: ácido nitroso

HA: hidroxilamina

HPUra: 6-(p-hidroxifenilazo)-uracilo

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. MATERIALES	
1) Bacterias y fagos.....	13
2) Medios de cultivo.....	15
3) Productos radioactivos.....	15
4) Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	16
5) Determinación de radioacti- vidad.....	16
6) Autorradiografía.....	16
7) Agentes mutagénicos.....	17
8) DNA de Ø29.....	17
9) Síntesis de DNA.....	17
10) Microscopía electrónica.....	18
11) Otros productos.....	18
12) Equipo.....	19
III. METODOS	
1) Medios de cultivo líquido.....	21
a) Medio nutritivo MLB.....	21
b) Medio definido MJ.....	21
c) Medio definido MM.....	22

2)	Medios de cultivo sólido.....	22
a)	Medio nutritivo MLB.....	22
b)	Medio definido MM.....	22
3)	Tampón de fago.....	23
4)	Ensayo de fago.....	23
5)	Antisuero contra Ø29.....	24
6)	Multiplicación de Ø29.....	25
7)	Mutagénesis de Ø29 normal con luz ultravioleta (UV).....	26
8)	Mutagénesis de <u>B. subtilis</u> MO-101-Psu ⁻ con etilmetano sulfonato.....	28
9)	Selección de la estirpe su- presora.....	31
a)	Selección por supresión de requerimientos.....	31
b)	Selección por supresión de mutantes sus de Ø29.....	32
10)	Irradiación con luz UV e in- corporación de radioactividad en bacterias.....	33
11)	Preparación de las proteínas marcadas en pulsos para elec- troforesis.....	36
a)	Electroforesis en tubo.....	36
b)	Electroforesis en placa.....	37

12)	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	37
a)	Electroforesis en tubo y sistema de pH discontinuo.....	37
b)	Electroforesis en placa y autorradiografía.....	39
13)	Recristalización de los reactivos para electroforesis.....	41
a)	Acrilamida.....	41
b)	N-N'-metilenbisacrilamida.....	42
c)	Dodecilsulfato sódico.....	42
14)	Determinación de radioactividad.....	42
15)	Mutagénesis de Ø29 normal con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.....	43
16)	Selección de mutantes sus de Ø29.....	45
a)	Selección por capacidad de crecimiento.....	45
b)	Selección sobre mezcla de bacterias.....	46
17)	Complementación.....	47
a)	Complementación cualitativa.....	47

b)	Complementación cuantitativa.....	49
18)	Recombinación.....	51
a)	Cruces de dos factores.....	51
b)	Cruces de tres factores.....	52
19)	Síntesis de DNA en bacterias infectadas.....	53
20)	Preparación de dobles mutantes.....	55
21)	Obtención de células competentes para rescate de marcadores.....	56
22)	Mutagénesis <u>in vitro</u> del DNA lineal de Ø29 o del fragmento EcoRI-A.....	57
a)	Mutagénesis con ácido nitroso.....	57
b)	Mutagénesis con hidroxilamina.....	58
c)	Mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguánidina.....	60
23)	Selección de mutantes sus de Ø29 en el cistron 8.....	61
a)	Selección por rescate de marcadores.....	61

b) Selección por complementación cualitativa.....	63
24) Preparación de partículas de fago marcadas radioactivamente.....	65
25) Análisis de las partículas de fago.....	66
a) Centrifugación en gradiente de ClCs.....	66
b) Centrifugación en gradiente de sacarosa.....	67
26) Microscopía electrónica.....	68
a) Preparación de las rejillas.....	68
b) Tinción negativa.....	69
IV. RESULTADOS	
1) Integración de las colecciones de mutantes sus y ts de $\phi 29$	71
a) Identificación de los cístrones.....	72
b) Síntesis de DNA en <u>B. subtilis</u> 110NA su ⁻ infectado con mutantes sus o ts de $\phi 29$ en presencia de HPURa en condiciones restrictivas.....	75

c)	Ordenación de los representantes de las diferentes colecciones de mutantes sus y ts de Ø29 en un mapa genético lineal.....	76
	I). Cruces de dos factores.....	78
	II). Cruces de tres factores.....	79
2)	Mutantes sus de Ø29 obtenidos por mutagénesis con luz UV.....	81
3)	Aislamiento de <u>B. subtilis</u> MO-101-P spoA ⁻ thr ⁻ (met ⁻) ⁺ su ⁺⁴⁴	82
4)	Proteínas inducidas por infección de <u>B. subtilis</u> MO-101-P su ⁻ y su ⁺⁴⁴ con los mutantes sus 15(212) y sus 12(47) de Ø29.....	84
	a) Proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora.....	85
	b) Proteínas sintetizadas en la estirpe supresora.....	88
5)	Revertientes del mutante sus 12(47).....	91

6)	Proteínas inducidas por infección de <u>B. subtilis</u> MO-101-P su ⁻ y su ⁺⁴⁴ y <u>B. subtilis</u> MO-99 su ⁺³ con el mutante sus 12(610).....	94
a)	Proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora.....	95
b)	Proteínas sintetizadas en las estirpes supresoras.....	96
7)	Mutantes sus de Ø29 obtenidos por mutagénesis con nitrosoguanidina.....	100
8)	Proteínas inducidas por infección de <u>B. subtilis</u> MO-101-P su ⁻ y su ⁺⁴⁴ y MO-99 su ⁺³ con los mutantes sus 8(769) y sus 8(22).....	103
a)	Proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora.....	103
b)	Proteínas sintetizadas en la estirpe supresora su ⁺³	105
c)	Proteínas sintetizadas en la estirpe supresora su ⁺⁴⁴	107

9)	Revertientes del mutante sus 8(22).....	110
10)	Proteínas inducidas por in- fección de <u>B. subtilis</u> MO- 99 su ⁺³ con los mutantes sus 16(121) y sus 16(172).....	112
11)	Mutantes sus en el cistron 8.....	115
12)	Mutantes sus de Ø29 en el cistron 8 obtenidos por mutagénesis <u>in vitro</u>	118
13)	Proteínas inducidas por infección de <u>B. subtilis</u> 110NA su ⁻ con los mutantes sus en el cistron 8 aisla- dos por mutagenésis <u>in vi-</u> <u>tro</u>	121
14)	Mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y sus 7(614).....	123
15)	Proteínas inducidas en la infección de <u>B. subtilis</u> 110NA su ⁻ con los mutan- tes sus A25, sus G10, sus H1, sus 7(614) y el rever- tiente IV.....	125
16)	Partículas de fago produ- cidas en condiciones res- trictivas por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y el revertiente IV.....	128

17)	Análisis de las partículas de fago producidas en con- diciones restrictivas por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y el revertien- te IV.....	129
a)	Centrifugación en gra- diente de ClCs.....	129
b)	Centrifugación en gra- diente de sacarosa.....	130
c)	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	131
d)	Microscopía electrónica.....	133
V.	DISCUSION.....	134
VI.	CONCLUSIONES.....	154
VII.	LEYENDAS A LAS FIGURAS.....	157
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	201

INTRODUCCION

Los virus bacterianos, o bacteriófagos, han sido objeto de numerosos estudios genéticos y bioquímicos para intentar comprender dos problemas básicos en Biología, el control de la expresión genética y el control de la base molecular del mecanismo de ensamblaje de las macromoléculas, que dan lugar a una estructura morfológica con una geometría y una función definidas.

Los bacteriófagos son estructuralmente simples. Constan, en líneas generales, de un material genético (DNA o RNA), cubierto por una estructura proteica regular compuesta de una o de unas pocas moléculas distintas de proteína. Su facilidad para replicar este material genético y para recubrirlo de proteínas utilizando una capacidad informativa mínima, han hecho de los bacteriófagos un material muy útil como sistema modelo para abordar la comprensión de la estructura y función de las macromoléculas que los componen, proteína y ácidos nucleicos.

Cuando un fago infecta a una bacteria, se producen una serie de sucesos ordenados que requieren la existencia de mecanismos de control que regulen la síntesis y la actuación de las proteínas virales, así como la replicación y transcripción del genoma viral.

Se ha descrito la existencia de mecanismos de control a nivel de la transcripción del DNA a RNA mensajero a tiempos tardíos después de la infección del huésped. Los bacteriófagos T3 y T7, específicos de Escherichia coli, dan lugar a la aparición de una nueva RNA polimerasa inducida (1-4) diferente de la RNA polimerasa de la bacteria. En la infección de E. coli por los bacteriófagos T4 (5) y λ (6-8) existen proteínas inducidas que son necesarias para la transcripción tardía y que modifican a la RNA polimerasa de la bacteria controlando de este modo la síntesis de los RNA mensajeros tardíos.

El mecanismo de ensamblaje de los diversos componentes virales en una estructura de morfología regular que protege al material genético viral, ha sido ampliamente estudiado en el caso de los bacteriófagos T4, λ y P22, específico este último de Salmonella typhimurium. A pesar de la relativa simplicidad genética y estructural de estos bacteriófagos, el número de productos génicos implicados en la morfogénesis de la partícula viral es elevado, siendo al menos de 10 en el caso de P22, de 21 en el caso de λ y de 45 en el caso T4 (9).

Teniendo en cuenta que el DNA del bacteriófago T7 tiene un peso molecular de 26×10^6 (10), el del fago λ , de 33×10^6 (11), el del fago P22 de 27×10^6 (12) y el del fago T4 de 110×10^6 (13), el número total de proteínas de tamaño medio que pueden especificar los diversos genomas (y por tanto el número teórico de genes contenidos en el DNA) es de unas 50 en el caso de T7, λ , y P22 y de unas 200 en el caso de T4.

El bacteriófago $\phi 29$ que infecta a Bacillus subtilis y a otras bacterias relacionadas como Bacillus amyloliquefaciens, contiene un DNA de doble cadena de peso molecular $11-12 \times 10^6$ (14-17), que se puede aislar a partir del virus como un círculo cerrado por una proteína específica (15), lo que está de acuerdo con el hecho de que la transfección por el DNA de $\phi 29$ es sensible al tratamiento con enzimas proteolíticos (18).

El pequeño tamaño del DNA fago $\phi 29$ le hace un material idóneo para el estudio del control de la expresión genética y de la morfogénesis de la partícula viral. La realización de este tipo estudio requiere el conocimiento previo del número, orden y función de los cistrones que componen el genoma del fago. Si

tenemos en cuenta el tamaño del DNA de $\phi 29$ y que la transcripción es asimétrica, transcribiéndose sólo una banda del DNA en cada zona del mismo (19-21), el DNA de $\phi 29$ sólo posee capacidad para determinar la síntesis de un reducido número de proteínas de tamaño medio, aproximadamente unas 20, lo que determina la existencia de otros tantos genes.

Si comparamos $\phi 29$ con los bacteriófagos antes mencionados, veremos que el número aproximado de genes que puede contener el DNA de $\phi 29$ es 3 veces menor que el que puede contener el genoma de T7, λ o P22 y 10 veces menor que el que puede contener el genoma de T4.

La dificultad de obtener mutantes letales condicionales en todos aquellos cistrones del genoma de un fago, cuyos productos estén implicados en el proceso que se desee estudiar, será tanto mayor cuanto mayor sea el número de dichos productos génicos. En el fago T4 se han obtenido mutantes en 80 cistrones (22), en 30 cistrones en el fago P22 (23) y en 25 el fago λ (24), es decir aproximadamente en la mitad o menos de los cistrones teóricamente contenidos en los respectivos genomas.

Estudios realizados en nuestro laboratorio (25-28) han permitido detectar la existencia de 7 proteínas estructurales en Ø29, dando cuenta de un 60% de la información genética del DNA del fago, con lo que el estudio de las funciones del resto de las proteínas no estructurales inducidas por el fago puede ser mucho más simple que en el caso de cualquiera de los bacteriófagos antes mencionados.

La detección de proteínas inducidas en la infección del huésped por fagos como T4 que detiene la síntesis de proteínas de la bacteria (29,30) o como T7 o λ que la inhiben parcialmente (31,32) no presenta dificultades. No obstante, Ø29 cuando infecta a B. subtilis no detiene la síntesis de proteína del huésped, por lo que para disminuir esta síntesis hasta unos niveles que permitan la identificación de las proteínas virales, es necesario utilizar la irradiación con luz ultravioleta antes de la infección con el fago (33-35). Por infección de B. subtilis, previamente irradiada con luz ultravioleta, con el fago Ø29 se ha detectado la existencia de 19 (36), 23 (37), 21 (38) y 22 (39) proteínas inducidas. De acuerdo con el

hecho de que dos de estas proteínas son el precursor y el fragmento producto del procesamiento del mismo en la síntesis de la proteína que forma los apéndices del cuello de Ø29 (40,41), el máximo número de proteínas inducidas detectadas después de la infección con Ø29 es de 21. Si la síntesis de todas estas proteínas inducidas está determinada por el DNA de Ø29, el 90% de la información genética del DNA viral sería empleada en la síntesis de las mismas.

Aunque han sido obtenidos mutantes termosensibles de Ø29 agrupados en 11 grupos de complementación por Talavera y col. (42) y en 13 grupos de complementación por Hagen y col. (43), para caracterizar las proteínas cuya síntesis está determinada por los diferentes genes de Ø29 y para estudiar la morfogénesis viral, es necesario obtener mutantes sin sentido del fago. Con este objeto han sido aisladas varias estirpes supresoras de B. subtilis (44-46); habiéndose determinado en el caso de la estirpe su⁺³ de Georgopoulos (45) y en el caso de la estirpe HA-101B de Okubo y Yanagida (44) que el supresor contenido en las mismas es un supresor de mutaciones sin sentido cuya eficiencia de supresión es de un 10% (47) y de un 27% (48), respectivamente.

Utilizando estirpes de B. subtilis derivadas de la estirpe su^{+3} (45), se han obtenido mutantes sensibles a supresor de $\phi 29$ por Moreno y col. (49) agrupados en 13 grupos de complementación, por Reilly y col. (50) y por Anderson y Reilly (51) agrupados en 14 grupos de complementación, y por McGuire y col. (38) agrupados en 8 grupos de complementación. Moreno y col. (49) complementaron su colección de mutantes su de $\phi 29$ con la de mutantes ts de Talavera y col. (42) agrupando los mutantes de ambas colecciones en un total de 17 grupos de complementación (49).

Con objeto de comprobar el número de cistrones en los que habían sido obtenidos mutantes letales condicionales de $\phi 29$, se procedió a la integración de los mutantes representantes de grupo de las colecciones de mutantes ts de Hagen y col. (43) y Talavera y col. (42) y de mutantes su de Reilly y col. (50) y Moreno y col. (49) mediante experimentos de complementación y a su ordenación en un mapa genético para facilitar la adopción de una nomenclatura común, mediante experimentos de recombinación con cruces de dos y tres factores.

Los agentes mutagénicos empleados en la obtención de los mutantes de $\phi 29$ pertenecientes a las

diferentes colecciones habían sido ácido nitroso, hidroxilamina, nitrosoguanidina, bromodeoxiuridina y trietilen melamina; por ello y con objeto de comprobar si empleando otros agentes mutagénicos, podían obtenerse mutantes de Ø29 en cistrones en los que aún no se poseían, se ha ensayado en un primer paso la irradiación con luz ultravioleta de las partículas de fago en suspensión.

La utilización de estirpes derivadas de B. subtilis su⁺³ como estirpes supresoras para el aislamiento de los mutantes sus de Ø29 pertenecientes a las diferentes colecciones, puede suponer, dada su débil eficiencia de supresión (47) un impedimento para la obtención de mutantes sus en determinados cistrones, especialmente en aquellos que determinen la síntesis de proteínas que se necesiten en grandes cantidades para el desarrollo del fago. Por ello, se procedió a aislar una estirpe supresora de B. subtilis cuya eficiencia de supresión fuera más elevada que la que posee la estirpe su⁺³.

En Escherichia coli, se han aislado varias estirpes supresoras de mutaciones sin sentido (52-54), habiéndose determinado que los tripletes UAA (ocre)

(53,55) y UGA (ópalo) (54,56) pueden ser solamente reconocidos, respectivamente, por supresores ocre y ópalo; sin embargo, el triplete UAG (ambar) (55,57) puede ser reconocido por supresores ambar y ocre indistintamente, lo que está de acuerdo con la hipótesis del relajamiento en el apareamiento codon-anticodon propuesta por Crick (58).

La presencia de cualquiera de estos tres triplete sin sentido en un RNA mensajero que se esté traduciendo, determina la terminación de la cadena polipeptídica que se esté sintetizando (59). El efecto de la terminación de la cadena polipeptídica puede ser suprimido como resultado de la producción de un tRNA alterado que sea capaz de reconocer el triplete sin sentido (60). Los supresores ambar y ópalo permiten que la continuación de la síntesis de la cadena polipeptídica tenga lugar con una eficiencia de un 20-60%, mientras que los supresores ocre poseen una eficiencia de supresión más débil (5-10%) (61). Los diferentes supresores caracterizados en E. coli insertan cada uno de ellos en la cadena polipeptídica un aminoácido característico en la posición correspondiente a la del triplete sin sentido que son capaces de reconocer (54, 62-65).

El hecho de que un mutante sin sentido de un fago sea correctamente suprimido por una estirpe bacteriana supresora dependerá en primer lugar de la eficiencia del supresor, que determinará la cantidad de proteína sintetizada, cantidad que puede ser suficiente o no para el normal desarrollo del mutante, y en segundo lugar de la aceptación del aminoácido suministrado por el tRNA que reconoce el triplete sin sentido, que puede hacer o no funcional a la proteína. Los supresores ocre suprimen normalmente a mutaciones ambar que afectan a genes que determinan funciones catalíticas, pero generalmente no suprimen a aquellas que afectan a genes que determinan funciones estequiométricas (66,67). Por lo tanto, los mutantes sin sentido de un fago, aislados en un supresor ocre podrán ser mutantes ambar u ocre, probablemente en genes determinantes de funciones catalíticas, pero los mutantes aislados en un supresor ambar, serán siempre mutantes ambar y podrán afectar tanto a genes determinantes de funciones catalíticas como estequiométricas.

La eficiencia de supresión de la estirpe B. subtilis su^{+3} , es sólo de un 10% (47), lo que sugiere que puede tratarse de un supresor ocre, y si la situación es similar a lo que ocurre en E. coli, los

mutantes sus de Ø29 aislados utilizando como supresores estirpes derivadas de B. subtilis su^{+3} , podrían ser mutantes ambar y ocre afectando a genes que determinen la síntesis de proteínas que se necesitan en poca cantidad para el desarrollo normal del fago. Por otra parte, mutantes en genes que determinen la síntesis de proteínas que se necesitan en grandes cantidades, como las proteínas estructurales mayoritarias u otras proteínas estequiométricas, podrían no haber sido aislados utilizando este supresor.

Con objeto de aislar una estirpe supresora de B. subtilis con elevada eficiencia de supresión, se partió de una estirpe $spoA^- leu^+$ derivada de B. subtilis Mu8u5u5 $leu^- met^- thr^- su^-$ (45). La estirpe su^{+3} tiene los requerimientos de metionina y treonina suprimidos, y si se trata de un supresor ocre, uno de estos dos requerimientos, o ambos, pueden venir determinados por mutaciones ambar, lo que podría permitir aislar a partir de la estirpe su^- supresores ambar que suprimirían una o ambas mutaciones, lo que fenotípicamente se traduciría en la supresión de uno o de los dos requerimientos. Los supresores ambar, por otra parte, deberían suprimir a los mutantes sus de Ø29 obtenidos con la estirpe su^{+3} . Ambos criterios han servido de base para el aislamiento y caracterización

del supresor buscado.

La utilización de la nueva estirpe supresora de B. subtilis permitió la obtención de mutantes sus de Ø29 en 3 cistrones para los que no habían sido encontrados mutantes sus por Moreno y col. (49).

Hasta presente, todos los mutantes sus de Ø29 localizados en el cistrón 8 y pertenecientes a las diferentes colecciones, mostraron ser incapaces de sintetizar en condiciones restrictivas la proteína mayoritaria de la cabeza del fago, proteína HP1, y la proteína que forma las fibras de Ø29, proteína HP3 (39, 40). El aislamiento de nuevos mutantes sus de Ø29 por mutagénesis in vitro del DNA del fago o del fragmento A del mismo producto de su digestión con la endonucleasa de restricción EcoRI de E. coli (68) utilizando un sistema de selección exclusivo para mutantes sus en el cistrón 8, así como los estudios realizados con estos mutantes y con mutantes sus que están afectados en el ensamblaje de la proteína HP3 en la partícula viral, permitieron determinar la parcial dispensabilidad de esta proteína.

MATERIALES

1) BACTERIAS Y FAGOS

El huésped no permisivo, B. subtilis 168 110NA try⁻ spoA⁻ su⁻ (69) se obtuvo del Dr. P. Schaeffer a través del Dr. F. Moreno. La bacteria permisiva, B. subtilis 168 MO-99 (met⁻ thr⁻)⁺ su⁺³ spoA⁻, se obtuvo del Dr. F. Moreno, quien la preparó por transformación (70) de B. subtilis Mu8u5u5 leu⁻ (met⁻ thr⁻)⁺ su⁺³ (45) con DNA de B. subtilis Marburg 3NA spoA⁻ su⁻ (69).

La bacteria no permisiva, B. subtilis MO-101-P spoA⁻ met⁻ thr⁻ su⁻, se obtuvo también del Dr. F. Moreno quien la preparó por transformación de la estirpe B. subtilis Mu8u5u5 leu⁻ met⁻ thr⁻ su⁻ con DNA de B. subtilis Marburg 3NA spoA⁻ su⁻. La estirpe supresora de elevada eficiencia, B. subtilis MO-101-P spoA⁻ thr⁻ (met⁻)⁺ su⁺⁴⁴ se obtuvo a partir de la estirpe de B. subtilis MO-101-P su⁻ como se describe en esta Tesis.

Para los experimentos de rescate de marcadores, se utilizó la bacteria B. subtilis Mu8u5ul.su⁻ obtenida del Dr. A. Portolés.

El fago Ø29 normal, se obtuvo originalmente del Dr. B.E. Reilly.

Los mutantes sensibles a supresor F513, K91, K442, O56, A422, E74, E136, E138, H542, H525, B47, I44, L600, L53, L55, M1241, N212, N345, D241 y P112, pertenecen a la colección de Moreno y col. (49).

Los mutantes sensibles a temperatura, tsF98, tsK132, tsC17, tsJ116, tsG93, tsA18, tsE54, tsH119, tsB108, tsD46, pertenecen a la colección de Talavera y cols. (42), y los mutantes tsQ1360 y tsI810, a la colección de Moreno y cols. (49). Los mutantes sensibles a supresor A628, B629, C717, D369, E626, F769, G614, H756, I302, O683, J305, J662, K330, N724, L300 y M741, pertenecen a la colección de Reilly y col. (50).

El mutante tsP219 pertenece a la colección de Hagen y col. (43).

En la Tabla I (ver resultados), se relacionan las colecciones de mutantes sus y ts de Ø29 utilizados procedentes de Minneapolis (43,50) y de Madrid (42,49) frente al número asignado a cada cistrón en una nomenclatura común a todas ellas en virtud de su integración en el mapa genético lineal de Ø29 ya establecido (49).

Los mutantes sensibles a supresor A25, G10 y H1, que presentan el fenotipo de lisis retrasada respecto al fago normal y que están afectados en el ensamblaje de la proteína que constituye las fibras del fago, se obtuvieron del Dr. B.E. Reilly.

El fago Ø29 radioactivo, marcado en la proteína con S^{35} fué obtenido de la Dra. M. Salas.

2) MEDIOS DE CULTIVO

La triptona, el extracto de levadura, el agar, la peptona, el medio para ensayo de antibióticos (Penicillium assay) y el Triptose Blood Agar Base, se compraron a Difco.

La D-glucosa, a Fisher Scientific Co. Los L-aminoácidos, a Sigma Chemical Co., y las sales, a Merck.

3) PRODUCTOS RADIOACTIVOS

La leucina- H^3 (1 mC/ml, 0.002 mg/ml) y la leucina- C^{14} (100 μ C/ml 0.028 mg/ml), se compraron a New England Nuclear. La Timidina- H^3 (1 mC/ml, 0.017 mg/ml), el hidrolizado de proteína- C^{14} (50 μ C/ml, 55 mC/m átomo de carbono) y el hidrolizado de proteína- H^3 (1 mC/ml, TRK 440, B.5) se compraron a The Radiochemical Center, Amersham.

4) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La acrilamida y la N,N'-metilenbisacrilamida, compradas a Bio-Rad Laboratories, se utilizaron sin recrystalizar.

La acrilamida de Serva Feinbiochemica GMBH Co. y la N,N'-metilenbisacrilamida de Merck, se recrystalizaron antes de usarse. La tetrametiletildiamina, se compró a Eastman Chemical Co. El SDS, a Sigma Chemical Co., y el persulfato sodico, a Canalco.

La urea se compró a Fisher y se desionizó con resina mixta de cambio iónico, obtenida de Seta.

5) DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD

El Butil-PBD, se compró a Ciba Ltd. el PPO y el dimetil POPOP, a Sigma Chemical Co., el tolueno, a Carlo Erba, y el papel de fibra de vidrio (Whatman GF/C y GF/A), a Reeve Angel.

6) AUTORADIOGRAFIA

La película utilizada fue Kodirex para Rayos X, de Kodak.

El Revelador Rápido para rayos X y el revelador DX-80, se utilizaron indistintamente, así como el

Fijador Acido Rápido o el fijador FX-40 para película de rayos X. Todos estos productos se compraron a Kodak. El plástico flexible Saran-Wrap o Handi-Wrap, utilizados indistintamente, se compraron a The Dow Chemical Company.

7) AGENTES MUTAGENICOS

El nitrito sódico y el hidrocloreto de hidroxilamina se compraron a Merck. La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, se compró a Mann Research Laboratories Inc. El etilmetano sulfonato se adquirió de Pfaltz and Bauer Inc.

8) DNA DE Ø29

El DNA lineal de Ø29 y el fragmento EcoRI-A de este DNA, fueron un obsequio de la Dra. M.R. Inciarte.

9) SINTESIS DE DNA

La droga HPURa fué un obsequio del Dr. N.C. Brown. La uridina se compró a Calbiochem.

10) MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las rejillas de cobre electrolítico (3 mm de diámetro, 200 mallas) se compraron a Veco Zeep-platen Fabrick N.V. El colodión se obtuvo de Mallinckrodt Chemical Co. El acetato de isoamilo se compró a Schuhardt GMBH y el acetato de uranilo a Merck.

11) OTROS PRODUCTOS

El 2-mercaptoetanol y la lisozima de clara de huevo se compraron a Sigma Chemical Co.

La DNasa pancreática (electroforéticamente pura o recristalizada una vez) y la RNasa pancreática (recristalizada una vez) se obtuvieron de Worthington Chemical Co.

El adjuvante incompleto de Freund, se compró a Difco.

El fluoruro de fenil-metilsulfonilo se compró a Sigma Chemical Co.

El etanol, el cloroformo, el éter, la acetona y el ácido tricloroacético, se compraron a Merck.

El papel Whatman 3MM, se compró a Whatman.

El Tris, se compró a Sigma Chemical Co.

El cloruro de cesio se compró a Merck y la sacarosa a May and Backer Ltd.

12) EQUIPO

Baños de agua con agitación rotatoria de New Brunswick Co. Inc., modelo G-76.

Baño de ambiente regulado por aire con agitación rotatoria de New Brunswick Co. Inc., modelo G-25.

Baños de incubación de Kowall y Lab-Line Instrument Inc.

Centrífugas: Sorvall, modelos SS3 y RC2-B.

Ultracentrífugas: Spinco de Beckman, modelos L2-50 y L3-50.

Espectrofotómetros: Beckman DU-2 y DB-GT y Spectronic de Bausch y Lomb.

Estufas: Elektro Helios.

pHmetro Radiometer, modelo 25 con escala expandida.

Liofilizadores Virtis, modelo 1000145-MRBA y Thelco.

Fuentes de alimentación: E-C. Apparatus Corp., Gelman Instrument Co., Buchler, modelo 3-1014A y Bio-Rad Laboratories, modelo 400.

Cubetas de electroforesis: Hoefer Scientific Instruments, para geles cilíndricos y SE-520.

Balanzas: Sartorius, Mettler tipo M-15 y Ohaus.

Contador de colonias New Brunswick, modelo C-110.

Fraccionadores de geles Mickle.

Contadores de centelleo líquido: Packard Tri-Carb., modelos 3003, 3320 y Nuclear Chicago Marck II.

Lámpara germicida de 15 W. de General Electric.

Placa calefactora EGA.

Densitómetro Chromoscan MKII de Joyce Loebel Co.

M E T O D O S

1) MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDO

a) Medio nutritivo MLB

Para el cultivo de bacterias para la valoración del fago Ø29, se utilizó medio LB (71) compuesto por triptona, 10 g/l, extracto de levadura, 5 g/l y ClNa, 5 g/l, suplementado con SO_4Mg 5 mM y D-glucosa 20 mM.

b) Medio definido MJ

Para los experimentos de marcaje de las proteínas inducidas por el fago Ø29, para los experimentos de síntesis de DNA por mutantes del fago Ø29, y para comprobación de requerimientos en medio líquido, las bacterias se crecieron en medio J, cuyas sales están constituidas por PO_4HNa_2 50 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 50 mM, Cl_2Mn 0,01 mM, Cl_2Ca 0,1 mM, Cl_2Mg 5 mM, ClNH_4 10 mM, SO_4Zn 0,01 mM, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 1 mM y "trazas de metales" compuestas por ClCo $0,25 \times 10^{-8}$ mg/l, SO_4Cu $0,025 \times 10^{-8}$ mg/l, y $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$ $0,25 \times 10^{-8}$ mg/l (72). Las sales se suplementan con D-glucosa 20 mM y la mezcla de los 20 aminoácidos naturales a concentración final 0,1 mM cada uno, excepto donde se indique otra cosa.

c) Medio definido MM

Para la comprobación de requerimientos en medio líquido, se utilizó el medio definido MM compuesto por las sales de Anagnostopoulos y Spizizen (73), suplementadas con ClNa 0,1 M, Cl_2Mn 0,01 mM, D-glucosa 20 mM y la mezcla de los 20 aminoácidos naturales a concentración final 0,1 mM cada uno, excepto donde se indique otra cosa.

2) MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOa) Medio nutritivo MLB

Para la valoración del fago Ø29 y de los mutantes, se utilizaron placas Petri conteniendo agar sólido compuesto por medio LB suplementado sólo con SO_4Mg 5 mM y agar al 1,5%. El agar semisólido, se preparó con medio LB y agar al 0,6%.

b) Medio definido MM

Para la comprobación de requerimientos en medio sólido, se utilizaron placas Petri conteniendo agar sólido compuesto por medio MM, suplementado como

se ha indicado, con excepción de la glucosa, y agar al 1,5%.

3) TAMPON DE FAGO

El tampón de fago utilizado (DF), contiene ClNa 0,1 M, Cl_2Mg 10 mM y Tris-ClH 0,05 M, pH 7.8. En este medio el título de los fagos no cambia durante varios meses a 4°C.

4) ENSAYO DE FAGO

Se empleó como bacteria indicadora B. subtilis 110NA su⁻ para fago normal y mutantes termosensibles y B. subtilis MO-99 su⁺³ ó B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴, para los mutantes sensibles a supresor. La bacteria se creció en medio LB suplementado con glucosa 20 mM hasta una concentración aproximada de 5×10^7 células/ml. El plaqueo se realizó sobre placas Petri preparadas como se indicó en Métodos 2 a).

El fago se ensayó según el método de Adams (74): 2 ml de agar semisólido se mezclaron con 0,5 ml de un cultivo de bacteria indicadora con 0,1 ml de fago diluido hasta la concentración deseada en DF. La mezcla

se extendió sobre una placa Petri que contenía aproximadamente 30 ml de agar sólido. Una vez solidificada la mezcla de agar-células - fago, se incubó la placa durante la noche en una estufa a 30°C (excepto donde se diga otra cosa), apareciendo una placa de lisis en el césped de bacteria indicadora por cada fago (o bacteria infectada) presente. Teniendo en cuenta el número de placas obtenidas y la dilución realizada, se puede calcular la cantidad de fago original. Las valoraciones del fago están realizadas con un mínimo de dos diluciones distintas.

La valoración del fago total producido a lo largo de una infección en la bacteria huésped, se realizó tomando alícuotas de 5 µl del cultivo infectado que se diluyeron en 0,5 ml de DF, conteniendo 250 µg de lisozima. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se plaquearon como se ha descrito. El número de placas de lisis obtenidas corresponde al número de fagos maduros en cada momento del desarrollo.

5) ANTISUERO CONTRA Ø29

Una cantidad de 2×10^{11} partículas de Ø29 normal, contenidas en 1 ml de DF se mezclaron con igual

volumen de adjuvante incompleto de Freund y se inyectaron intraperitonealmente en conejos. Este tratamiento se repitió tres veces con intervalos de una semana. Diez días después de la última inyección, se extrajo la sangre del conejo y se incubó durante 30 minutos a 56°C para inactivar el complemento y después durante 2 horas a 30°C para facilitar la coagulación. El coágulo se sedimentó por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. El suero sobrenadante se almacenó a -20°C. La constante de inactivación de Ø29 obtenida varió entre 200 y 400 min⁻¹.

6) MULTIPLICACION DE Ø29

Para la multiplicación de Ø29 normal o de los mutantes, se empleó el método de lisis confluyente en medio sólido. Para ello se sembraron placas Petri en condiciones permisivas con bacteria indicadora y el fago que se deseaba multiplicar en cantidad suficiente para producir lisis completa del césped bacteriano. El producto de la lisis confluyente se resuspendió añadiendo a cada placa 4 ml de DF e incubando 4 a 6 horas a temperatura ambiente y en reposo. Recogida la resus-

pensión se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm para sedimentar restos de agar y de bacterias y el sobrenadante se pasó a través de filtros Millipore estériles de $0,45 \mu$ de diámetro de poro. El filtrado se almacenó a 4°C. Las suspensiones de fago así obtenidas alcanzaron títulos entre 5×10^{10} y 1×10^{11} ufp/ml y por placa Petri recogida.

Cuando se necesitó obtener suspensiones de fago de mayor concentración, el volumen procedente del filtrado se sometió a centrifugación a alta velocidad durante 75 min a 40.000 rpm en el rotor 42-1 de la ultracentrífuga Spinco L2-50 ó L3-50 y se re-suspendió en, aproximadamente, un 0,8% del volumen de partida. Las nuevas suspensiones de fago así preparadas, alcanzaron títulos entre 1×10^{12} y 5×10^{12} ufp/ml.

7) MUTAGENESIS DE Ø29 NORMAL CON LUZ ULTRAVIOLETA (UV).

La luz ultravioleta ha sido uno de los agentes mutagénicos más comunmente utilizados para el aislamiento de mutantes de bacterias y de bacteriófagos a pesar de que aún hoy no está del todo aclarado el me-

canismo por el cual la luz UV ejerce su acción mutagénica, si bien parece depender en un primer paso de la formación de dímeros de timina cuya presencia en una banda de DNA actuando como molde en replicación, induce mutaciones por adición y/o delección y transiciones $AT \rightarrow GC$ (75).

Para mutagenizar partículas de $\phi 29$ infectivas con luz UV, se procedió de la siguiente manera : un volumen de 5 ml de una solución de $\phi 29$ normal en DF a concentración de 1×10^{12} ufp/ml contenida en una placa Petri, se irradió con una lámpara germicida de luz UV a intensidad de $80 \mu A$ durante 150 segundos, lo que produjo una disminución del 99,5% en la infectividad del fago (figura 1).

Alícuotas de la solución irradiada se segregaron infectando a multiplicidad 0,1 diferentes cultivos de 1 ml de B. subtilis MO-99 su^{+3} a concentración de 1×10^8 células/ml. Se incubaron los cultivos infectados durante 90 minutos a $30^{\circ}C$ con agitación y se lisaron artificialmente con lisozima a concentración final de 500 $\mu g/ml$, incubando 30 minutos adicionales a $30^{\circ}C$ con agitación. A continuación, los lisados se centrifu

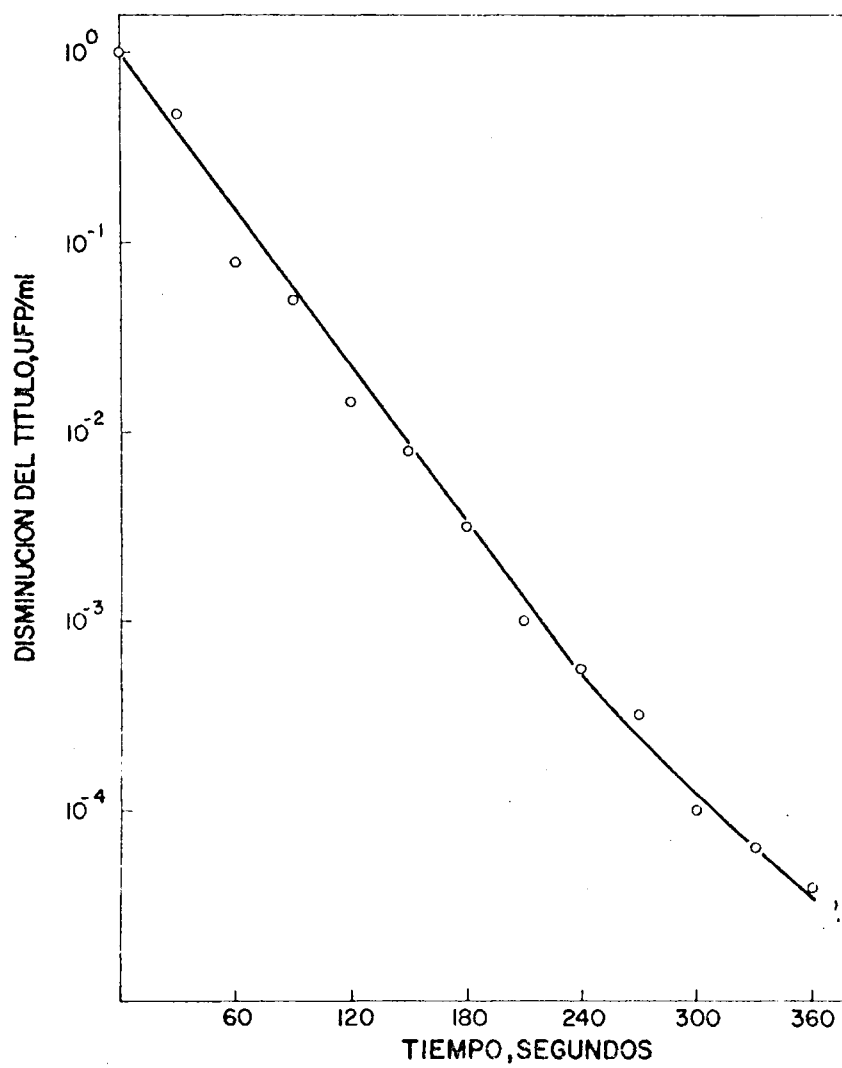


Figura 1. Inactivación de ø29 normal por irradiación con luz UV.

garon a 10.000 rpm durante 5 minutos para eliminar restos celulares y los sobrenadantes se almacenaron a 4°C.

Los mutantes sensibles a supresor, uno por cada cultivo segregado (para evitar repeticiones), se seleccionaron por su capacidad de crecer sobre B. subtilis MO-99 su^{+3} , y no sobre B. subtilis 110NA su^{-} . Cada cultivo segregado se plaqueó sobre su^{+3} y de ahí se replicó con un replicador de 121 agujas sobre su^{-} y su^{+3} ; aquellos que únicamente crecían sobre la estirpe supresora se resuspendieron en DF y se volvieron a replicar con palillos estériles. Los mutantes que se confirmaron se resuspendieron en DF y se almacenaron una vez multiplicados en condiciones permisivas, como se indicó en Métodos 6.

8) MUTAGENESIS DE B. SUBTILIS MO-101-Psu⁻ CON ETILMETANO SULFONATO.

Los agentes alquilantes, etilmetano sulfonato y etiletano sulfonato fueron las primeras sustancias químicas que mostraron poseer un elevado poder mutagénico. Estos agentes reaccionan con el DNA etilando la posición 7 del anillo de purina de guanina o adenina.

Esta reacción es seguida de hidrólisis del enlace purina-deoxirribosa y pérdida eventual de la base púrica de la cadena polinucleotídica. La banda del DNA en la que se ha producido la eliminación de la purina, cuando actúe como molde en replicación permitirá que frente al hueco producido, se inserte cualquiera de las 4 bases en la banda complementaria que está siendo sintetizada "de novo". La inserción de una pirimidina incorrecta, o de una purina, provocará un cambio permanente en la secuencia de bases, esto es, se producirá la mutación. Se pueden producir, por tanto, transiciones y transversiones.

Osborn y col.(76) han demostrado la gran eficacia del etilmetano sulfonato como agente inductor de supresores ambar en E. coli; por ello, se escogió este agente en nuestro laboratorio para la obtención de un supresor de elevada eficiencia en B. subtilis.

Para mutagenizar se empleó el siguiente procedimiento: 10 ml de un cultivo de B. subtilis MO-101-P $su^- spoA^- met^- thr^-$ creciendo exponencialmente en MJ suplementado como se indica en Métodos 1b, a una concentración de 1×10^8 células/ml, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos y el sedimento se resus-

pendió en la mitad del volumen original; una alícuota de 2 ml de la resuspensión, se diluyó cuatro veces en una mezcla que contenía 7,6 ml de Tris-ClH 1 M, pH 7,5 y 0,4 ml de EMS, con lo que la concentración final de células resultó de 4×10^7 células/ml y la de EMS, del 4% (v/v).

Como control de la estabilidad de las células en estas condiciones durante el tratamiento, una alícuota de 1 ml de la resuspensión de partida se diluyó igualmente 4 veces en Tris-ClH 1 M, pH 7,5 en ausencia de agente mutagénico.

Los cultivos se incubaron a 26°C con agitación fuerte y, después de 1 y 2 minutos, se tomaron alícuotas de 2 ml que se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa de 25 mm de diámetro y 0,45 μ de diámetro de poro y se lavaron 3 veces con igual volumen de Tris-ClH 1 M, pH 7,5, para eliminar el EMS. Las células se resuspendieron en MLB suplementado sólo con SO_4Mg 5 mM por incubación a 26°C durante 30 minutos con agitación suave. En la figura 2 se representa la estabilidad del cultivo no tratado con EMS frente a la letalidad de los tratamientos durante 1 y 2 minutos, a los que corresponden supervivencias del 0,5% y 0,25%, respectivamente.

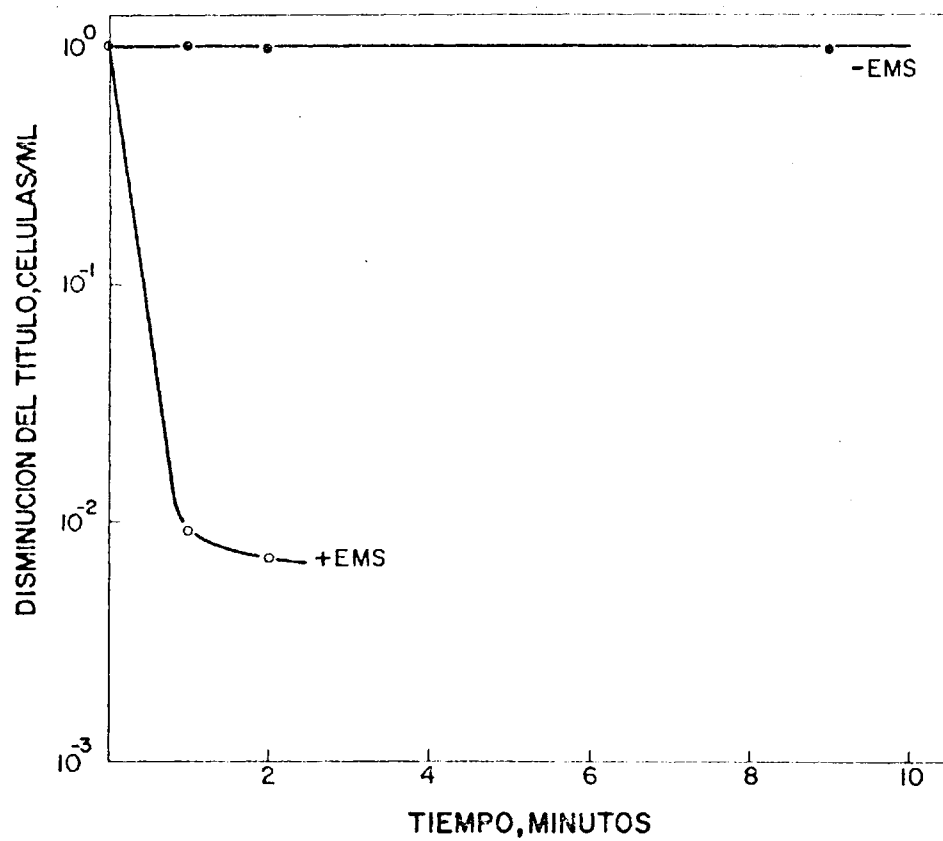


Figura 2. Disminución de la viabilidad de B. subtilis MO-101-P su⁻ por tratamiento con EMS.

Las células resuspendidas se dejaron segregar en MLB suplementado como se indicó en Métodos 1a hasta que alcanzaron una concentración de 1×10^8 células/ml. Se centrifugaron entonces a 10.000 rpm durante 5 minutos y se lavaron 2 veces con igual volumen de sales del medio J, siendo resuspendidas después del último lavado en 1/10 del volumen de partida de sales del medio J, lo que da una concentración de 1×10^9 células/ml.

9) SELECCION DE LA ESTIRPE SUPRESORA

La selección de la estirpe supresora se abordó utilizando el doble criterio que a continuación se describe:

a) Selección por supresión de requerimientos

Un volumen de 0,1 ml de la solución de bacterias mutagenizadas, segregadas y resuspendidas en sales del medio J, se extendió con un asa de vidrio sobre placas Petri conteniendo MM sólido suplementado (como se indica en Métodos 2b) con mezclas de los 20 aminoácidos naturales, en las que se omitieron Met, Thr o ambos aminoácidos, a concentración 0,1 mM cada

uno, para obtener colonias revertientes individuales que mostrarán la facultad de poder crecer sin alguno (o los dos) de los requerimientos de la estirpe paterna. Como control del número de células puesto por placa (1×10^8), un volumen de 0,1 ml de la misma solución diluída convenientemente, se sembró sobre placas Petri de MM sólido suplementado con la mezcla de 20 aminoácidos naturales sin excluir ninguno de ellos. Todas aquellas colonias (eligiendo una por placa para evitar repeticiones) que mostraron la reversión buscada, se resuspendieron en 1 ml de MM líquido suplementado como se indica en Métodos 1c exceptuando el aminoácido o aminoácidos para el (o los) que presentaron reversión y fueron nuevamente ensayadas en MM sólido como comprobación. Una vez comprobadas, se volvieron a resuspender en 1 ml de MM líquido suplementado análogamente y se dejaron crecer a 37°C con agitación hasta que alcanzaron la fase exponencial, momento en que se añadió glicerol al 50% y se almacenaron los cultivos a -20°C.

b) Selección por supresión de mutantes sus de Ø29.

Gotas de soluciones de mutantes sus de Ø29 de

la colección de Moreno y col (49) a concentración de 10^7 ufp/ml en DF, se pusieron con un complementador de 25 varillas sobre placas Petri conteniendo MLB sólido preparado como se describe en Métodos 2a), previamente sembradas con 0,5 ml de cultivos en fase exponencial de cada uno de los revertientes seleccionados, llevándose como controles de lisis negativa y positiva, respectivamente, placas testigo previamente sembradas con B. subtilis 110NA su^- y MO-99 su^{+3} . Los revertientes que sólo permitieron el desarrollo de algun(os) mutante(s) sus pero no del resto probado, se seleccionaron y se comprobaron por plaqueo directo de los mutantes sus sobre ellos, llevando de nuevo plaqueos de control negativo y positivo, respectivamente, sobre B. subtilis 110NA su^- y MO-99 su^{+3} . De esta forma se seleccionó la estirpe B. subtilis MO-101-P $spoA^-$ thr^- (met^-) su^{+44} .

10) IRRADIACION CON LUZ UV E INCORPORACION DE RADIO- ACTIVIDAD EN BACTERIAS.

Las bacterias B. subtilis 110NA su^- , MO-101-P su^- , MO-99 su^{+3} y MO-101-P su^{+44} , se crecieron en medio definido (MJ), conteniendo 20 aminoácidos (MÉ-

todos 1b) a concentración de 0,1 mM cada uno, hasta 1×10^8 células/ml. Un volumen de 80 ml del cultivo de bacterias se concentró dos veces por centrifugación y resuspensión en la mitad de volumen de partida de las sales del medio (sales MJ). Los 40 ml de bacterias resuspendidas se pusieron en una placa Petri de 19 cm de diámetro colocada en una plataforma giratoria y se irradiaron con una lámpara germicida de 15 W colocada a 50 cm de altura sobre la muestra, durante el tiempo que se indicará para cada estirpe bacteriana.

Después de irradiación, las bacterias se concentraron 2,5 veces para obtener una concentración final de 5×10^8 células/ml en un medio (MJ) que contenía los aminoácidos a concentración 0,5 mM. Las bacterias se infectaron con Ø29 normal o con diferentes mutantes sus a multiplicidad de infección de 20 fagos por bacteria y se incubaron a 37°C con fuerte agitación. Siempre se llevó como control un cultivo en el mismo medio de bacterias sin infectar. A diferentes tiempos después de la infección, se sacaron alícuotas de los cultivos infectados para seguir el desarrollo del fago.

Al minuto 15 después de la infección (excepto donde se indique otra cosa), se sacaron alícuotas de los cultivos infectados con mutantes sus, que se marcaron con leucina- C^{14} (7,5 uC/ml; 0,02 mM), y alícuotas del cultivo infectado por el fago normal o del cultivo sin infectar, que se marcaron con leucina- H^3 (25 uc/ml; 0,02 mM). Se utilizó 3,3 veces más actividad específica de H^3 que de C^{14} debido a que la eficiencia de conteo de H^3 es 3,3 veces menor que la de C^{14} . Así, los resultados obtenidos en bacterias infectadas por el fago normal o sin infectar, son cuantitativamente comparables con los obtenidos en bacterias infectadas con mutantes sus.

En aquellos casos en que los cultivos marcados iban a ser analizados posteriormente por electroforesis en placa, tanto las bacterias infectadas con mutantes sus o con fago normal, como las bacterias sin infectar, se marcaron exclusivamente con leucina- C^{14} .

Al minuto 60 después de la infección (excepto donde se indique otra cosa), las bacterias se enfriaron en hielo y se sedimentaron por centrifugación a 10.000 rpm en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall a 4°C durante 10 minutos.

11) PREPARACION DE LAS PROTEINAS MARCADAS EN PULSOS
PARA ELECTROFORESIS.

a) Electroforesis en tubo

Cada sedimento se resuspendió en la mitad del volumen original en un tampón de lisis que contenía Tris-ClH 30 mM, pH 6,8, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,58 mM y lisozima, 500 µg/ml. La suspensión se incubó a 0°C durante 2,5 horas, se congeló y descongeló tres veces y se trató con RNasa pancreática a concentración de 10 µg/ml durante 30 minutos a 0°C. Para quitar aminoácidos radioactivos residuales, la proteína se precipitó con ácido tricloroacético a concentración final del 10% durante 15 minutos a 0°C. El precipitado se sedimentó por centrifugación en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sedimento se lavó una vez con igual volumen de una mezcla de etanol-éter en proporción 1:1 y dos veces con etanol-éter en proporción 1:3. El sedimento final se secó bajo una corriente de nitrógeno y se preparó para la electroforesis como se indica más adelante.

b) Electroforesis en placa

Las proteínas se prepararon como se indica en el apartado anterior, con la diferencia de que la proteína se precipitó por adición de 10 volúmenes de acetona e incubación a 37°C durante 1 hora, seguida de centrifugación a 5.000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente y el residuo se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.

12) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

a) Electroforesis en tubo y sistema de pH discontinuo.

Las muestras de proteína precipitada se disolvieron en 0,2 ml de tampón de disociación que contenía Tris-ClH 0,0625 M, pH 6,8, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5% y urea 6 M, y se calentaron de 3 a 5 minutos en un baño de agua hirviendo.

Se llevó a cabo la electroforesis en geles de 10 cm de longitud y 0,55 cm de diámetro, siguiendo el sistema descrito por Laemmli (77). El gel de separa-

ción contenía acrilamida 10%, N-N'-metilenbisacrilamida 0,25%, Tris-ClH 0,325 M, pH 8,8, SDS 0,1% y tetrametiletilendiamina 0,05% y se polimerizó con un volumen 1/100 de persulfato amónico, 37,5 mg/ml. El gel de concentración contenía acrilamida 3%, N-N'-metilenbisacrilamida 0,25%, Tris-ClH 0,125 M, pH 6,8, SDS 0,1% y tetrametiletilendiamina 0,1% y se polimerizó como el gel de separación.

El electrolito que se utilizó se componía de Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, ajustado a un pH de 8,6, conteniendo SDS al 0,1%.

Las electroforesis se corrieron a 90 voltios durante 5,5 horas. Los geles se cortaron en fracciones de 0,8 mm con un cortador de geles Mickle y las fracciones se pusieron en viales, a los que se añadió 0,25 ml de SDS al 0,1%. Los viales se congelaron y descongelaron 3 veces y se incubaron durante la noche a 37°C con agitación suave para eluir la proteína del gel.

La radioactividad presente en cada vial se determinó como se describe en Métodos 14, poniendo en cada vial un papel de fibra de vidrio Whatman GF/A de 2,5 cm de diámetro y secando lentamente a 80-85°C.

b) Electroforesis en placa y autorradiografía

Las muestras de proteína precipitada se disolvieron en 75 μ l de un tampón formado por Tris-ClH 0,0625 M, pH 6,8, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5% y urea 6 M y se calentaron de 3 a 5 minutos en un baño de agua hirviendo.

Las placas de gel se formaron en un aparato de Hoefer Scientific Instruments de 30 cm de longitud, 14 cm de anchura y 1,5 mm de grosor.

El gel de separación se preparó a partir de las dos soluciones siguientes:

I) Tris-ClH 0,325 M, pH 8,8, acrilamida 10%, N-N'-metilenbisacrilamida 0,25%, SDS 0,1%, tetrametil-etilendiamina 0,05% y se añadió 1/200 (v/v) de persulfato amónico, 25 mg/ml, para polimerizar el gel.

II) Idéntica a la descrita arriba, pero con acrilamida al 20% y N-N'-metilenbisacrilamida 0,33%.

Cada solución enfriada previamente, se colocó en las cubetas de un formador de gradientes lineales y la mezcla se bombeó en el aparato de electroforesis desde abajo.

El gel de concentración que se utilizó ha sido descrito en Métodos 12a.. Antes de polimerizar el gel de concentración, se introdujo en el aparato un peine formador de cámaras, que se retiró cuando finalizó la polimerización. Las dimensiones de las cámaras para las muestras eran de 4 mm de largo por 1,5 mm de ancho, espaciadas 2,5 mm entre sí.

El electrolito utilizado fue el que se ha descrito en Métodos 12a.. La electroforesis se llevó a cabo durante 15 horas a una intensidad constante de 20 mA por placa.

Una vez finalizada la electroforesis, los gels se secaron según una modificación del método de Fairbanks (78). Debajo del gel, se colocó una lámina de plástico flexible Saran Wrap y en la parte superior se colocó papel Whatman 3 MM y una tela de acero inoxidable. El gel preparado de esta forma, se introdujo entre dos láminas de caucho de silicona, una de las cuales tenía un orificio que se conectó a una bomba de vacío y se colocó sobre una placa calefactora a 150°C, hasta que se secó (1-2 horas).

El gel, ya seco, se puso en contacto con una película Kodirex durante el tiempo que en cada caso

se indica, en completa oscuridad. La película se reveló con revelador rápido para Rayos X durante 3-5 minutos y se fijó con fijador rápido para uso radiográfico durante 5 minutos.

Para realizar la densitometría de las placas de película de autorradiografía, éstas se cortaron en tiras de aproximadamente 1 cm de anchura y se midieron en el densitómetro Chromoscan MKII, a una longitud de onda entre 610 y 690 nm.

13) RECRISTALIZACION DE LOS REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS.

Se realizó según el método descrito por Loening (79).

a) Acrilamida

Setenta gramos de acrilamida se disolvieron en 1 litro de cloroformo a 50°C y la disolución se filtró por papel. El filtrado se dejó cristalizar a -15°C durante 12 horas y los cristales se recogieron por filtración y se secaron en vacío.

b) N-N'-metilenbisacrilamida

Diez gramos de N-N'-metilenbisacrilamida se disolvieron en 1 litro de acetona a 45°C. La solución se filtró por papel y el filtrado se dejó cristalizar a -15°C durante 12 h. Los cristales se recogieron por filtración y se secaron en vacío.

c) Dodecilsulfato sódico

Se añadieron 60 g de SDS a 2 litros de etanol 97% en ebullición y se filtraron en caliente. El filtrado se dejó cristalizar durante 12 h a temperatura ambiente y los cristales se recogieron por filtración y se secaron por liofilización.

14) DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD

La determinación de radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5%, se realizó por precipitación durante 15 minutos a 0°C seguida de filtración en frío a través de discos de fibra de vidrio Whatman GF/C de 2,5 cm de diámetro. Los filtros se lavaron con ácido tricloroacético al 5% frío y se colocaron dentro de pequeños viales (4,5 x 1,2 cm) para

secarlos en estufa a 120°C durante 1 hora.

A los viales con los filtros secos se les añadieron 3 ml de líquido de centelleo (4 g de butil-PBD por litro de tolueno a 50 mg de dimetil-POPOP y a 4 g de PPO por litro de tolueno) y se contaron en contadores de centelleo líquido Packard TriCarb o Nuclear Chicago.

La radioactividad total se determinó aplicando la alícuota que se deseaba contar directamente a un disco de papel de fibra de vidrio Whatman GF/A de 2,5 cm de diámetro y secando en estufa a 90-120°C. Una vez seco el filtro se añadió al vial el líquido de centelleo y se contó en los contadores ya mencionados.

15) MUTAGENESIS DE Ø29 NORMAL CON N-METIL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINA.

La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina es uno de los agentes mutagénicos más ampliamente utilizados sobre bacterias y bacteriófagos, dadas sus amplias posibilidades de inducir mutaciones, ya que actúa sobre el DNA en replicación mutagenizando el punto de repli-

cación del cromosoma (80). Su acción es similar a la de los agentes alquilantes (descrita en Métodos 8), metilando el nitrógeno en posición 7 de la guanina, labilizándose la unión de la base a la deoxirribosa y perdiéndose eventualmente dicha base. Las posiciones que han quedado libres en la cadena del DNA, pueden, al replicarse la molécula de DNA, quedar ocupadas por cualquiera de las cuatro bases, dando lugar a la producción de transversiones y transiciones.

La mutagénesis de Ø29 normal con NG se llevó a cabo siguiendo el método de Moreno y col (49) : un volumen de 5 ml de un cultivo de B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴, creciendo exponencialmente a 37°C, se infectó con fago Ø29 normal a multiplicidad de infección de 10 fagos por bacteria. Después de 15 minutos de incubación a 37°C con agitación, se añadieron a la vez antisuero contra Ø29 (de manera que la constante de inactivación fuera de 1 min⁻¹) y 100 µg/ml de NG, y se prosiguió la incubación durante 10 minutos en las mismas condiciones. A este tiempo, se diluyó el cultivo infectado 5 veces y se distribuyó en 5 tubos, obteniéndose 5 cultivos con una concentración de 20 µg/ml de NG. Se continuó la incubación en análogas condiciones durante otros 10 minutos, momento

en el que se repitió la dilución de cinco veces y el reparto de cada cultivo en otros cinco, obteniéndose así 25 cultivos con una concentración de 4 µg/ml de NG, a los que se permitió segregarse en las mismas condiciones de incubación durante 115 minutos, es decir, hasta el minuto 150 después de la infección. A este tiempo, se añadieron 300 µg/ml de lisozima a los cultivos y se incubó durante 15 minutos adicionales en idénticas condiciones para permitir la lisis completa de las células.

Los cultivos lisados se diluyeron 1000 veces para eliminar la actividad mutagénica residual de NG y se almacenaron a 4°C.

16) SELECCION DE MUTANTES SUS DE Ø29

Los mutantes sus obtenidos por mutagénesis con NG fueron seleccionados de dos maneras diferentes:

a) Selección por capacidad de crecimiento.

Los mutantes (uno por cada cultivo segregado para evitar repeticiones) se seleccionaron por su capacidad de crecer sobre B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ y

no sobre B. subtilis 110NA su⁻. Cada cultivo segregado se plaqueó sobre la estirpe su⁺, y de ahí, con un replicador de 121 agujas, se replicó sobre placas Petri previamente sembradas con 110NA su⁻ y MO-101-P su⁺⁴⁴; aquellos que únicamente crecían sobre la estirpe supresora, se resuspendieron en DF y se volvieron a replicar con palillos estériles. Los mutantes que se confirmaron, se resuspendieron en DF y se almacenaron, una vez multiplicados en condiciones permisivas, como se indicó en Métodos 6.

b) Selección sobre mezcla de bacterias.

Alícuotas de cada cultivo segregado, se mezclaron con una concentración aproximada de 2×10^8 células/ml de B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ durante 10 minutos para permitir la adsorción del fago; a continuación se añadió B. subtilis 110NA su⁻ a una concentración aproximada de 1×10^8 células/ml y en una relación su⁻/su⁺ = 1/6 y se plaqueó la mezcla. Después de incubar toda la noche a 30°C, las placas de lisis pequeñas, turbias y de morfología irregular, se replicaron con palillos estériles sobre placas Petri previamente sembradas con B. subtilis 110NA su⁻ y MO-101-P su⁺⁴⁴, respectivamente, y aquellas que únicamente cre-

cían en la estirpe supresora se resuspendieron en DF y se volvieron a replicar con palillos estériles. Con los mutantes confirmados se procedió como se indicó en el apartado anterior.

17) COMPLEMENTACION

Los mutantes sus de Ø29 se sometieron a experimentos de complementación con el fin de diferenciar mutantes lesionados en genes distintos. Los experimentos de complementación se basan en el test cis-trans empleado por Lewis en *Drosophila* (81) y aplicado al bacteriófago T4 de *E. coli* por Benzer (82). Al infectar dos mutantes sus diferentes a una estirpe no supresora, el desarrollo de fago ocurrirá normalmente si ambas mutaciones se encuentran en un gen diferente; ahora bien, si las mutaciones afectaran al mismo gen, el desarrollo de fago no sería superior al alcanzado por infección individual con cada uno de los mutantes.

a) Complementación cualitativa

I). Los mutantes sus de Ø29 obtenidos como se describe en Métodos 7, se clasificaron respecto a los grupos de complementación ya establecidos por Moreno y col (49), por ensayos en placa preformados de la si-

guiente manera :

Gotas de soluciones en DF de mezclas por parejas de mutantes sus de Ø29 a concentración de 10^7 ufp/ml se pusieron sobre placas de MLB previamente sembradas con B. subtilis 110NA su⁻, con un complementador de 25 varillas. Como control, se pusieron gotas de soluciones en DF a la misma concentración de cada uno de los mutantes sus que se iban a complementar. Se consideró complementación positiva la aparición de lisis en la zona donde se puso la gota de la mezcla cuando en las zonas correspondientes a los mutantes por separado no se observó lisis alguna. La complementación se consideró negativa cuando no tuvo lugar la lisis en la zona correspondiente a la mezcla de mutantes.

II). Los mutantes sus de Ø29 obtenidos como se indica en Métodos 15, se clasificaron de acuerdo con los grupos de complementación previamente establecidos por Moreno y col (49) y por Reilly y col (50) por ensayos en placa preformados de diferente manera :

Placas de lisis de cada mutante obtenidas por plaqueo sobre B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ se replica-

ron con palillos estériles y, en el siguiente orden, sobre placas de MLB previamente sembradas con B. subtilis 110NA su⁻, como control negativo, 110NA su⁻ preinfectado con 2×10^6 - 2×10^7 ufp/placa Petri de un mutante sus representante de grupo y MO-101-P su⁺⁴⁴ en último lugar, como control positivo. La complementación se consideró negativa cuando no se formó placa de lisis sobre la placa Petri sembrada con 110NA su⁻ preinfectada.

En aquellos casos en que tanto un tipo de ensayo en placa como el otro resultaron dudosos, o en que la complementación resultó negativa, los mutantes se clasificaron por el método de complementación cuantitativa como se describe a continuación.

b) Complementación cuantitativa.

La complementación cuantitativa de los mutantes sus de Ø29 se llevó a cabo como describen Moreno y col. (49), de la siguiente manera : un cultivo de 1 ml de B. subtilis 110NA su⁻ creciendo exponencialmente a 42°C en medio MLB suplementado como se indica en Métodos 1a, a una concentración de 1×10^8 células/ml, se infectó con cada par de mutantes a multiplicidad de infección de 10 fagos por bacteria.

Después de 10 minutos de incubación, el fago no adsorbido se precipitó por adición de antisuero contra Ø29 de modo que la constante de inactivación fuera 1 min^{-1} . Al minuto 15 después de la infección, el cultivo se diluyó 5.000 veces en MLB suplementado como se indicó y se prosiguió la incubación durante 105 minutos. A ese tiempo, se añadió cloroformo al cultivo infectado para favorecer la lisis de las células y después de 10 minutos adicionales de incubación, la producción de partículas infectivas se determinó por plaqueo sobre B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ o B. subtilis MO-99 su⁺³.

Siempre se llevó un control de infección simple de los mutantes cuya complementación se quería estudiar. La temperatura de incubación a lo largo del ensayo fue de 42°C. El índice de complementación es la producción de fago expresada como porcentaje de la obtenida en células infectadas por el fago normal en las mismas condiciones. Cuando el índice de complementación es inferior al 0,5%, se considera, en líneas generales, como complementación negativa.

18) RECOMBINACION

Para la integración de los mutantes sus de Ø29 obtenidos como se ha descrito (Métodos 7 y 15) y de los mutantes sus representantes de grupo de la colección de Reilly y col (50) dentro del mapa genético de Ø29 ya existente (49). Se realizaron cruces de dos y tres factores mediante las técnicas que se detallan a continuación :

a) Cruces de dos factores

Se realizaron como indican Moreno y col (49), siendo el procedimiento análogo al descrito para los experimentos de complementación cuantitativa (Métodos 17b) con la excepción de que el huésped fue B. subtilis MO-99 su⁺³ o B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ y la temperatura de incubación fue de 30°C. El título de partículas infectivas se determinó por plaqueo en una u otra estirpe supresora a 30°C; el número de recombinantes de fenotipo normal, procedentes de mutantes sus, se determinó por plaqueo en B. subtilis 110NA su⁻ a 30°C y los recombinantes de fenotipo normal procedentes de mutantes sus y ts, por plaqueo en B. subtilis 110NA su⁻ a 45°C.

Las frecuencias de recombinación se calcularon como 2 veces el número de placas de lisis observadas en condiciones restrictivas dividido por el número de placas en condiciones permisivas. El valor obtenido se multiplicó por un factor de corrección debido a la eficiencia de plaqueo del fago normal, determinado para cada bacteria a las dos temperaturas utilizadas y en cada recombinación efectuada. El porcentaje de recombinación es 100 veces la frecuencia de recombinación.

b) Cruces de tres factores

Los cruces de tres factores se realizaron sólo cuando el orden relativo de dos mutantes sus no se pudo establecer claramente por cruces de dos factores. El método empleado fue el descrito por Moreno y col (49) que se esquematiza a continuación : Supongamos dos mutantes sus, que se encuentran en este caso, sus_1 y sus_2 . Para determinar su orden relativo, se construyeron los dobles mutantes respectivos, como se indica más adelante, con un mutante ts localizado a la izquierda o a la derecha de los dos mutantes sus. Si se efectúan ahora los cruces : (1) sus_1 -ts x sus_2 y (2) sus_2 -ts x sus_1 , bastará determinar en la pro-

genie el número de recombinantes de fenotipo normal para el carácter *sus* (sus^+) por plaqueo sobre *B. subtilis* 110NA su^- a 30°C, y el número de recombinantes de fenotipo normal para el doble carácter *sus-ts* ($sus^+ ts^+$) por plaqueo sobre *B. subtilis* 110NA su^- a 45°C. Si la relación $sus^+ ts^+ / sus^+$ es más alta en el cruce (1) que en el cruce (2), el orden de los mutantes estudiados será, $ts-sus_1-sus_2$; si la relación $sus^+ ts^+ / sus^+$ es más alta en el cruce (2) que en el cruce (1), el orden será $ts-sus_2-sus_1$.

19) SINTESIS DE DNA EN BACTERIAS INFECTADAS

La droga 6-(p-hidroxifenilazo)-uracilo (HPUra) inhibe la síntesis del DNA de la bacteria, sin afectar a la síntesis de DNA del fago (83,84,38) por interaccionar específicamente con la DNA polimerasa III del huésped (85,56).

Con objeto de comprobar si mutantes *sus* o *ts* asignados a cistrones implicados en la síntesis de DNA (83,39) por los criterios de complementación y recombinación (Métodos 17,18), manifestaban el fenotipo DNA⁻ (síntesis de DNA negativa en condiciones restric-

vas), se utilizó el siguiente procedimiento (38) : un cultivo en MJ suplementado como se ha descrito (Métodos 1b) de B. subtilis 110NA su⁻, creciendo exponencialmente hasta que la concentración de bacterias fue de 1×10^8 células/ml, se concentró 5 veces por centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall, y resuspensión en el mismo medio suplementado de la misma manera, pero con los aminoácidos a concentración 0,5 mM en vez de 0,1 mM. A la resuspensión se añadió HPura 0,4 mM y uridina a concentración final de 200 µg/ml. Las células se infectaron con Ø29 normal o con los diferentes mutantes a una multiplicidad de infección de 20 fagos por bacteria, y se marcaron desde la infección con timidina-H³ (2 µC/ml, 19 C/mmol). En cada experimento se llevó un control de células sin infectar. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de los cultivos infectados para determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% frío como se describió en Métodos 14. A varios tiempos después de la infección se tomaron también alícuotas para seguir el desarrollo del fago en los cultivos infectados (Métodos 4).

20) PREPARACION DE DOBLES MUTANTES

Los dobles mutantes sus-ts se prepararon por recombinación como se ha descrito en Métodos 18a (cruces de dos factores) pero en este caso, las placas de lisis obtenidas por plaqueo sobre la estirpe supresora a 30°C, fueron replicadas con palillos estériles (en el siguiente orden) sobre placas Petri de MLB, previamente sembradas con B. subtilis 110NA su⁻, B. subtilis MO-99 su⁺³ y B. subtilis MO-99 su⁺³, que se incubaron a 30°C, 45°C y 30°C, respectivamente.

Los dobles mutantes sus-ts serían incapaces de desarrollarse en las dos primeras condiciones, para hacerlo únicamente en la tercera; el recombinante de fenotipo normal será capaz de desarrollarse en las tres condiciones. Los presuntos dobles mutantes así obtenidos, se plaquearon de nuevo sobre B. subtilis MO-99 su³ a 30°C y las placas individuales se replicaron de nuevo en las condiciones antes citadas. Aquellos mutantes para los que se confirmó que poseían la doble mutación, se identificaron por complementación cualitativa primero (como se indica en Métodos 17a , I y II), se multiplicaron en condiciones per-

misivas (Métodos 6) y nuevamente se identificaron por complementación cuantitativa (Métodos 17b). Los dobles mutantes así caracterizados se almacenaron a 4°C.

21) OBTENCION DE CELULAS COMPETENTES PARA RESCATE DE MARCADORES.

Se empleó el procedimiento descrito por Bott y Wilson (87,88), operándose de la siguiente forma : una colonia de la estirpe B. subtilis Mu8u5ul crecida durante un mínimo de 15 días en una placa de agar (Difco Tryptose Blood Agar Base), se inoculó en medio para ensayo de antibióticos de Difco y se cultivó durante 8 horas. Al cabo de este tiempo, las células se sedimentaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en igual volumen de sales inorgánicas ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,06%, PO_4HK_2 1,4%, citrato sódico 0,1%, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,2%, SO_4Mg 0,07%); una alícuota de la resuspensión se añadió a un medio para el crecimiento formado por las sales inorgánicas suplementadas con glucosa 0,5%, 25 µg/ml de los aminoácidos, histidina, triptófano, arginina, valina, lisina, treonina, glicina y aspártico, 50 µg/ml de los aminoácidos leucina e isoleucina y 75 µg/ml de metionina, de modo

que se obtuviera en la siembra una densidad óptica a 420 nm comprendida entre 0,05 y 0,1.

El cultivo se mantuvo a 4°C en reposo durante la noche y al día siguiente se permitió el crecimiento por incubación a 37°C con agitación, siguiendo su desarrollo por medidas de densidad óptica a 420 nm a diferentes tiempos. Se definió T_0 (Fig. 3) como el momento en que el crecimiento dejó de ser logarítmico. En nuestras condiciones, la eficiencia máxima para el rescate de marcadores se obtuvo a T_3 (3 horas después de T_0).

22) MUTAGENESIS IN VITRO DEL DNA LINEAL DE Ø29 DEL FRAGMENTO EcoRI A.

a) Mutagénesis con ácido nitroso

Cuando un ácido nucleico se trata con ácido nitroso, las bases citosina y adenina son desaminadas para dar, respectivamente, uracilo e hipoxantina, y el resultado es un cambio en el apareamiento, puesto que el uracilo es capaz de aparearse con adenina, e hipoxantina puede aparearse con citosina, provocando en la siguiente ronda de replicación del DNA, respectivamen-

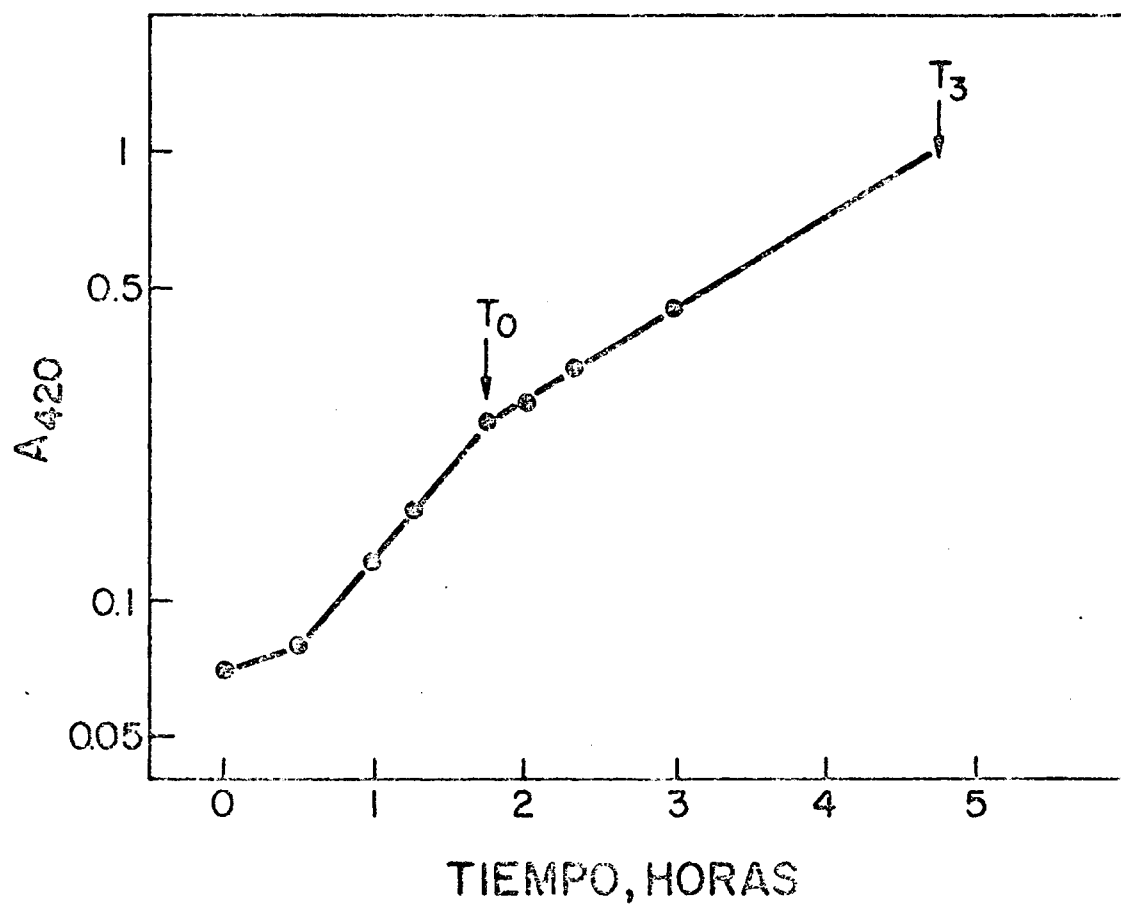


Figura 3. Obtención de *B. subtilis* en fase competente.

te, sustituciones de una purina (guanina) por otra (adenina) y de una piridimina (timina) por otra (citosina), y con ello transiciones de pares de bases G-C a pares A-T y de pares A-T a pares G-C.

Para mutagenizar el DNA lineal de ϕ 29 o el fragmento EcoRI-A del mismo, se siguió el procedimiento de Strack y col. (89), operándose de la siguiente forma : el DNA lineal de ϕ 29 o el fragmento EcoRI-A se diluyeron en acetato sódico 0,5 M tamponado con ClH a pH 4,2, a una concentración final de 100 μ g/ml y 50 μ g/ml, respectivamente. A esta solución se añadió NO_2Na a concentración final 0,1 M. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37°C con agitación suave, se paró la reacción diluyendo 10 veces en 0,1 x SSC y se ensayó a continuación rescate de marcadores como se indica más adelante. El tratamiento en estas condiciones dió una viabilidad alrededor del 10% para el DNA lineal de ϕ 29 (figura 4).

b) Mutagénesis con hidroxilamina

La acción mutagénica de la hidroxilamina sobre el DNA, se debe a su capacidad de reacción, práctica-

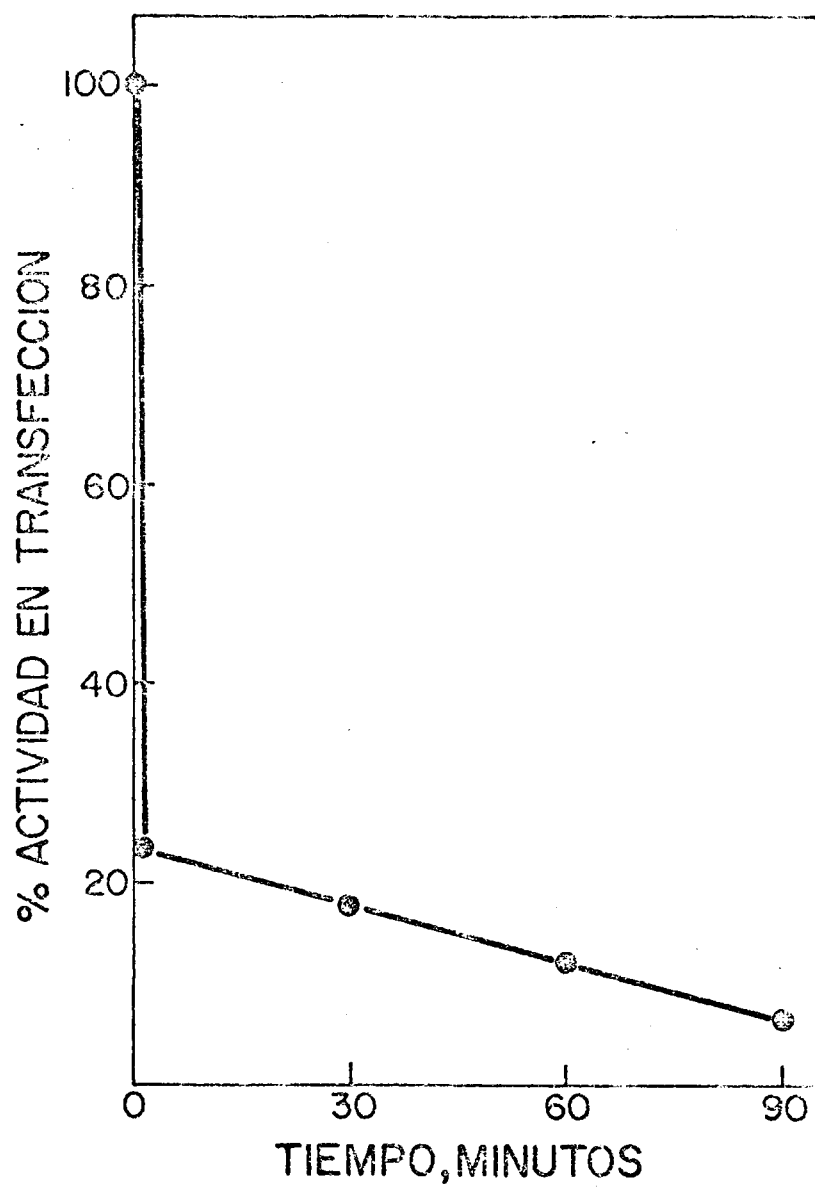


Figura 4. Inactivación del DNA lineal de $\phi 29$ por tratamiento con ácido nitroso.

mente específica, con citosina, dando lugar a 4,5-dihidro-4-hidroxilaminocitosina y la forma tautomérica más frecuente de este compuesto es incapaz de aparear con guanina en la replicación del DNA, apareando en cambio con adenina, dando lugar así a transiciones de pares de bases G-C a pares A-T.

Para mutagenizar el DNA lineal de ϕ 29 o el fragmento EcoRI-A del mismo, se procedió como ha sido ya descrito por Strack y col (89) y por Freese y col (90), operándose de la siguiente manera : a una mezcla formada por ClNa 5 M y NaOH 10 M se añadieron el DNA lineal o el fragmento EcoRI-A a concentraciones finales de 100 μ g/ml y 50 μ g/ml, respectivamente, hidrocloreuro de hidroxilamina a concentración final 1 M y H₂O destilada estéril, de manera que la concentración final de Na⁺ fuera 3 M y el pH de la solución final fuera de 6,2.

La mezcla se incubó a 75°C durante 60 minutos en reposo. La reacción se paró diluyendo 10 veces en 0,1 x SSC y se ensayó inmediatamente el rescate de marcadores como se indica más adelante. El tratamiento dió una viabilidad alrededor del 10% para el DNA lineal de ϕ 29 (figura 5).

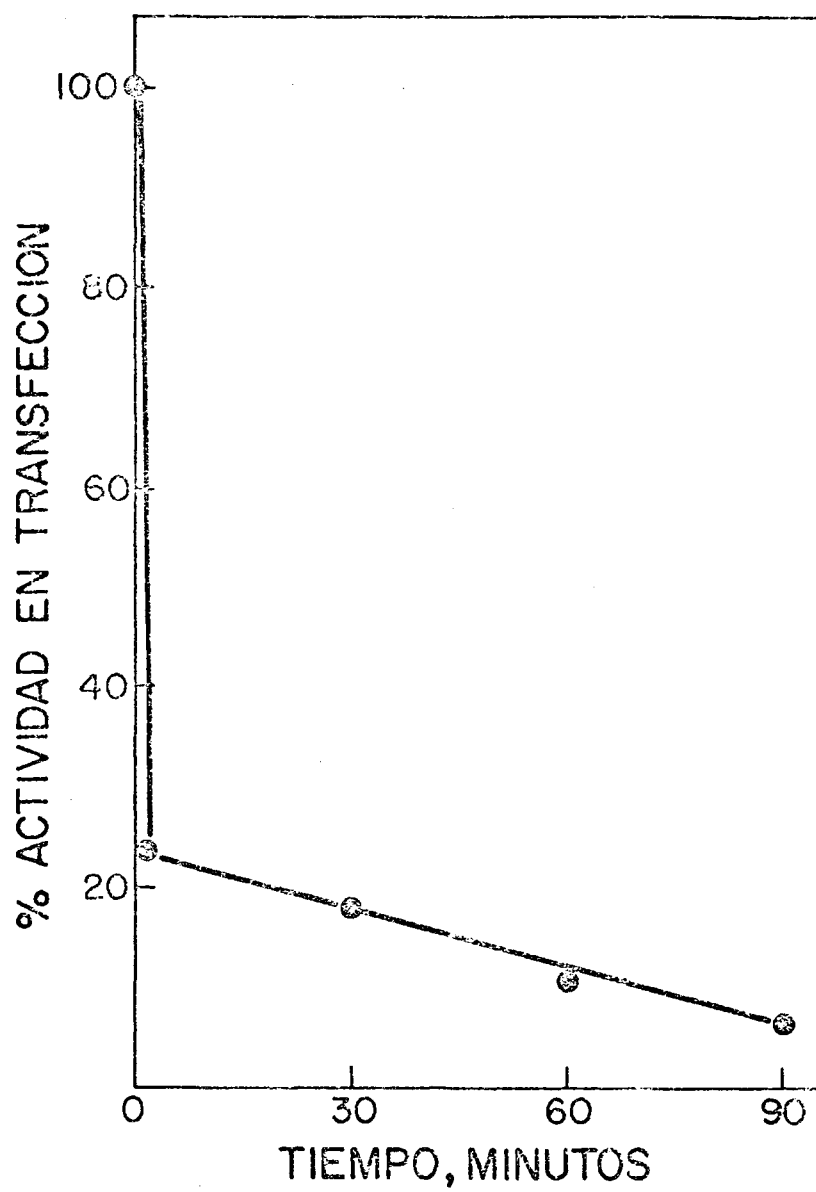


Figura 5. Inactivación del DNA lineal de ø29 por tratamiento con hidroxilamina.

c) Mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

La acción mutagénica de la nitrosoguanidina in vivo es debida a la metilación de la guanina en el DNA. No obstante, ha sido descrito por La Polla y col. (91) que la nitrosoguanidina en solución, en condiciones que favorecen su descomposición, es capaz de inactivar el DNA transformante, tanto a un pH superior a 5,5 como a pH inferior, quizá debido, en el primer caso, a metilación, ya que la nitrosoguanidina puede descomponerse en N-nitrourea y un ión metildiazonio, o quizá debido, en el segundo caso, a deaminación, descomponiéndose en N-metil-N'-nitroguanidina y ácido nitroso.

Con objeto de comprobar si en condiciones de descomposición de nitrosoguanidina y por tanto, de inactivación del DNA, podría este agente ejercer alguna actividad mutagénica, se intentó mutagenizar in vitro el DNA lineal de ϕ 29 o el fragmento EcoRI-A de este DNA, mediante el siguiente procedimiento : la solución formada por Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5, DNA lineal de ϕ 29 o fragmento EcoRI-A a concentraciones finales de 100 μ g/ml y 50 μ g/ml, respectivamente, y nitrosoqua-

nidina a concentración final de 1 mg/ml, se incubó a 37°C con agitación suave durante 4 horas. La reacción se paró diluyendo 10 veces en 0,1 x SSC y se ensayó inmediatamente rescate de marcadores como se indica más adelante.

En las condiciones del tratamiento, la nitro-soguanidina se descompone en un 68% (98) y la inactivación del DNA lineal de Ø29 en la transfección llega a ser del 90% (figura 6).

23) SELECCION DE MUTANTES SUS DE Ø29 EN EL CISTRON 8.

La selección de los mutantes sus del fago en el cistrón 8, obtenidos por mutagénesis in vitro, se llevó a cabo en dos pasos consecutivos, que se describen a continuación :

a) Selección por rescate de marcadores

Cultivos de 1 ml de B. subtilis Mu8u5u1 competente en T3, obtenidas como se describe en Métodos 20, se infectaron con el doble mutante sus4(56)-ts8(93) a multiplicidad de infección de 20 y se superinfectaron

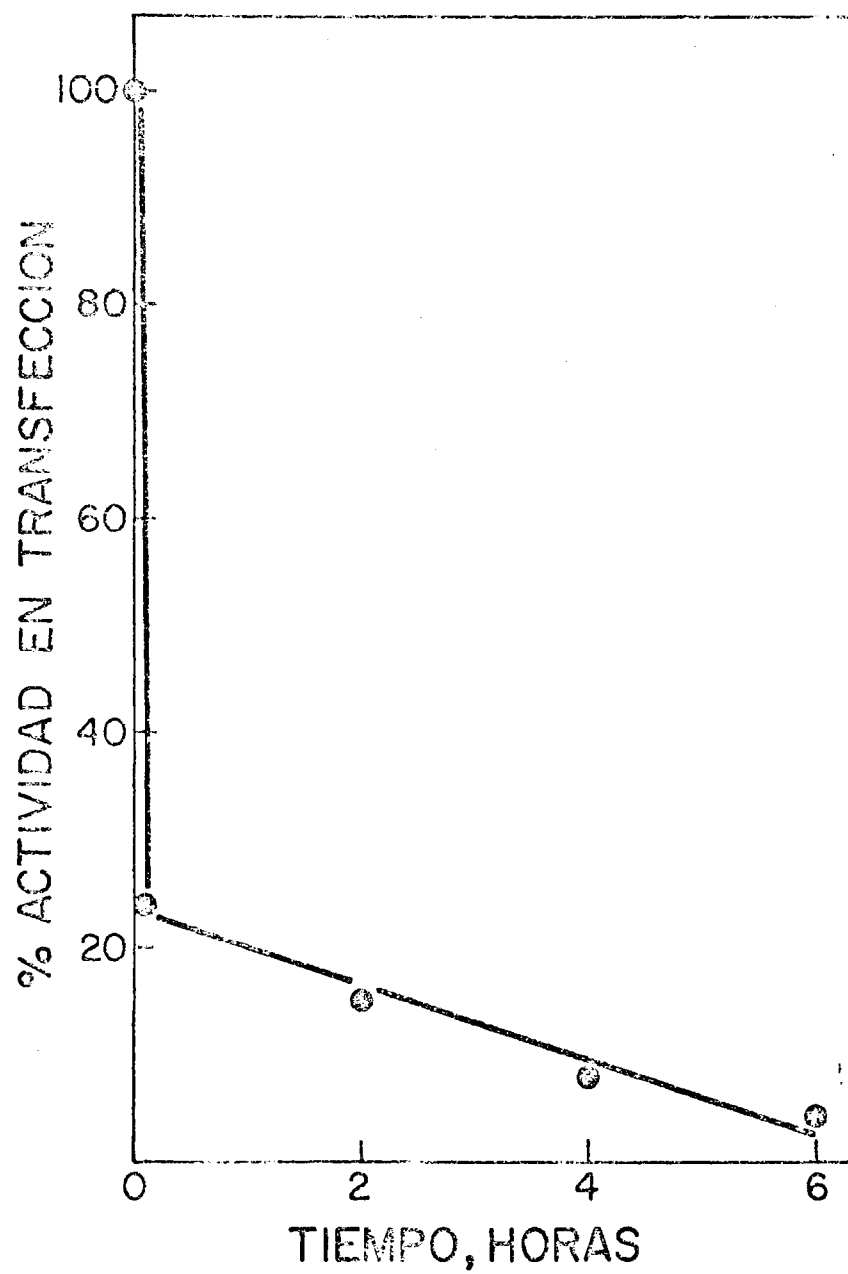


Figura 6. Inactivación del DNA lineal de ø29 por tratamiento con nitrosoguanidina.

con DNA lineal de Ø29 o fragmento EcoRI-A, mutagenizados, a concentraciones de 1 µg/ml y 0,5 µg/ml, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante 30 minutos, al cabo de los cuales se añadió a cada cultivo antisuero contra Ø29 (10 µl) para precipitar el fago no adsorbido y DNasa a una concentración final de 100 µg/ml para digerir el DNA no incorporado, continuándose la incubación en las mismas condiciones durante 10 minutos. Las células se sedimentaron y resuspendieron en 1 ml de DF y alícuotas o diluciones convenientes de las mismas se plaquearon para titular centros infectivos (bacterias infectadas) como se ha descrito (Métodos 4) empleando B. subtilis MO-99 su⁺³ como bacteria indicadora e incubando las placas a 45°C. Los centros infectivos así obtenidos se resuspendieron en 1 ml de DF y se almacenaron a 4°C.

En todos los casos, se llevaron como controles las infecciones simples por el doble mutante, por el DNA lineal de Ø29 o el fragmento EcoRI-A y las infecciones dobles de mutante y DNA o fragmento sin haber sido disuelto en la mezcla mutagénica y a los 0 minutos de tratamiento con el agente mutagénico.

Siempre se llevó un control de rescate de marcadores titulando los centros infectivos por plaqueo sobre B. subtilis 110NA su⁻ e incubando las placas a 45°C, condiciones en las que sólo puede desarrollarse Ø29 normal.

En las infecciones simples con DNA lineal de Ø29 o con fragmento EcoRI-A, la aparición de centros infectivos fue siempre negativa.

b) Selección por complementación cualitativa

Los centros infectivos resuspendidos se plaquearon sobre B. subtilis MO-99 su⁺³ a 45°C y las placas de lisis obtenidas se replicaron con palillos estériles, y en el siguiente orden, sobre placas Petri previamente sembradas con B. subtilis 110NA su⁻, 110NA su⁻ preinfectado con 2×10^7 ufp/placa Petri del mutante sus 8(769) y MO-99 su⁺³ (análogamente a como se ha descrito en Métodos 17a II). Las placas se incubaron a 30°C durante la noche.

Los mutantes sus en el cistrón 8 serán incapaces de desarrollarse en las dos primeras condiciones para hacerlo únicamente en la tercera. El fago normal será capaz de desarrollarse en las tres condiciones y

un mutante sus en cualquier otro cistrón, se desarrollará en las dos últimas condiciones solamente.

Los presuntos mutantes sus en el cistrón 8 así obtenidos, se plaquearon de nuevo sobre B. subtilis MO-99 su⁺³ a 30°C y las placas individuales se replicaron de nuevo en las condiciones antes citadas, pero invirtiendo el orden de las placas situadas en primera y última posición, de forma que la condición totalmente permisiva fuera en primer lugar para evitar que el presunto mutante a confirmar, pudiera contaminarse con el mutante sus8(769).

Aquellos mutantes para los que se confirmó que pertenecían al cistrón 8, se identificaron nuevamente por complementación cuantitativa como se describe en Métodos 17b y se localizaron genéticamente por cruces de dos factores (Métodos 18a).

Se seleccionó solamente un mutante en el cistrón 8 por centro infectivo para evitar repeticiones.

24) PREPARACION DE PARTICULAS DE FAGO MARCADAS
RADIOACTIVAMENTE.

Para la obtención de las partículas marcadas radioactivamente, producidas en condiciones restrictivas por los mutantes sus de Ø29, B. subtilis 110NA su⁻, se creció a 37°C en medio definido MJ suplementado como se indicó en Métodos 1b., hasta una concentración de 1×10^8 células/ml. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 10.000 rpm en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall durante 5 minutos. Las células se resuspendieron a una concentración de 5×10^8 células/ml en MJ, suplementado con glucosa 20mM y la mezcla de aminoácidos a concentración de 0.5 mM cada uno, se añadieron 20 µC/ml del hidrolizado de proteína -H³ o 2.5 µC/ml del hidrolizado de proteína-C¹⁴ y se infectaron con los diversos mutantes sus de Ø29 a una multiplicidad de infección de 20 fagos por bacteria. Los cultivos infectados se incubaron a 37°C hasta que lisaron o durante 120 minutos si los mutantes sus empleados eran defectivos en lisis. Durante este tiempo se valoró la producción de fago total y la incorporación de radioactividad en material insoluble en ácido tricloroacético al 5%. Una vez lisados los

cultivos, bien naturalmente o bien artificialmente por adición de 500 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima, se añadieron 1 $\mu\text{g/ml}$ de DNasa, 1 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa pancreática y 15 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima, incubándose durante 30 minutos a 37°C. A continuación se centrifugaron los cultivos a 10.000 rpm durante 10 minutos en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall a 4°C para eliminar restos celulares, y el sobrenadante se centrifugó 90 minutos a 40.000 rpm a 4°C en el rotor 42.1 de la ultracentrífuga Spinco L3-50. El sedimento se resuspendió en 0.5 ml de DF y se puso en la parte superior de un gradiente de ClCs por capas de densidades 1.1, 1.3 y 1.5 g/cm^3 . Se centrifugó 40 minutos a 40.000 rpm a 15°C en el rotor SW 50 L de la ultracentrífuga Spinco L3-50 y se fraccionó el gradiente, contándose la radioactividad presente en cada fracción tomando una alícuota que se precipitó con ácido tricloroacético al 5%. Las fracciones que contenían el fago, se dializaron frente a DF y se almacenaron a 4°C.

25) ANALISIS DE LAS PARTICULAS DE FAGO.

a) Centrifugación en gradiente de ClCs.

Las partículas de fago producidas en con-

diciones restrictivas por el mutante sus 14(1241), marcadas con H^3 en la proteína, se mezclaron con las partículas de fago producidas por los diversos mutantes, en las mismas condiciones, marcadas con C^{14} en la proteína y se diluyeron hasta un volumen de 5 ml con DF se añadieron 0.68 g de ClCs por gramo de la solución formada, de modo que la densidad resultante fuera de 1.44 g/cm^3 y se centrifugó hasta equilibrio en el rotor Ti 50 de la ultracentrífuga Spinco L3-50 a 15°C durante 37 horas a 25.000 rpm. Los gradientes se fraccionaron y se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% para cada fracción.

Las partículas de fago del mutante sus 14 (1241) tienen la misma densidad que el fago normal y se utilizan por ello como marcadores de esa posición (92).

b) Centrifugación en gradiente de sacarosa

En cada una de las dos cámaras de un formador de gradientes se pusieron 2.5 ml de dos soluciones de sacarosa del 5% y 20% (peso/volumen) en DF. El gradiente de sacarosa que se formó se recogió sobre

un tubo de nitrocelulosa de 5 ml de capacidad. En la parte superior del gradiente se puso una mezcla de las partículas de fago producidas por el mutante sus 14(1241) marcadas con H^3 en la proteína como marcador de posición de sedimentación, y de las partículas producidas por los diversos mutantes, marcadas con C^{14} en la proteína. Los gradientes se centrifugaron durante 25 minutos a 40°C a 35.000 rpm en el rotor SW 50.1 de la ultracentrífuga Spinco L3-50, y se fraccionaron, determinándose la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% para cada fracción.

26) MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Las partículas de fago producidas en condiciones restrictivas por los diversos mutantes sus de Ø29, se contrastaron por tinción negativa (93).

a) Preparación de las rejillas

Un portaobjetos limpio se sumergió hasta unos 2/3 de su longitud en un recipiente que contenía una solución de colodión al 0.75% en acetato de iso-amilo. El portaobjetos se sacó de la solución y se mantuvo a temperatura ambiente para permitir la evapo-

ración del disolvente, quedando una fina película de colodión sobre la superficie del portaobjetos. La película se hizo flotar sobre la superficie de agua destilada en una placa Petri y sobre la misma se colocaron las rejillas de cobre electrolítico (3 mm de diámetro, 200 mallas) con la cara brillante sobre la película. Las rejillas se recogieron mediante un papel de filtro que se fué depositando sobre la película hasta quedar totalmente húmedo y en contacto con ella. Las rejillas recogidas en el papel de filtro se dejaron secar a 40°C. Una vez seco el papel de filtro con las rejillas se introdujo dentro de un evaporador en el que previamente se habían montado dos electrodos de carbón, a través de los que se hizo pasar una corriente eléctrica que se mantuvo hasta que sobre el papel de filtro, situado a 20 cm de los electrodos, quedó depositada una capa de carbón de unos 50-100 Å^o de espesor.

b) Tinción negativa

La rejilla así preparada se sujetó con unas pinzas de punta fina y se puso en contacto durante 30 segundos con la superficie esférica de una gota que contenía la muestra y el líquido retenido en la rejilla

se secó con el borde de un papel de filtro. La rejilla conteniendo la muestra se puso en contacto de igual manera con una gota de acetato de uranilo al 2% durante 30 segundos y se secó con papel de filtro.

Las preparaciones se observaron en un microscópio electrónico Jeol a un voltaje de 80 KV y con una apertura de objetivo de 50 nm.

RESULTADOS

1) INTEGRACION DE LAS COLECCIONES DE MUTANTES
SUS Y TS DE Ø29

La tabla I muestra una relación de los mutantes sus representantes de grupo de la colección de Reilly y col. (50) y del mutante ts P219 de la colección de Hagen y col. (43), indicándose el nombre del lugar de su procedencia (Minneapolis), así como una relación de los representantes de grupo de la colección de mutantes sus de Moreno y col. (49) y de la colección de mutantes ts de Talavera y col. (42) junto con los mutantes ts Q1360 y ts I810 de Moreno y col. (49), indicándose análogamente el nombre de la ciudad donde se obtuvieron (Madrid) y que han sido utilizados como base para la integración de los mutantes arriba citados (42,43,49,50) de acuerdo con el mapa genético lineal de Ø29 anteriormente establecido (49).

Mediante experimentos de complementación y cruces de dos y tres factores, se han podido identificar 17 cistrones y construir un mapa genético lineal que permite utilizar una nomenclatura similar a la que empleó Studier con el fago T7 (94).

Los cistrones han sido numerados secuencialmente de izquierda a derecha (1 a 17), de acuerdo con

Tabla I. Mutantes de Ø29 representantes de las diferentes colecciones.

Cistrón	Minneapolis		Madrid	
	sus	ts	sus	ts
1	B629			
2	A628		F513	F98
3	C713		K91, K442	K132
4	D369		O56	
5		P219		C17
6	E626			Q1360
7	G614			J116
8	F769			G93
9	H756		A422	A18
10	I302		E74, E136 E138	E54
11	O683		H542, H525	H119
12	J305, J662		B47	B108
13	K330		I44, L600 L53, L55	I810
14			M1241	
15	N724		N212, N345	
16	L300		D241, D545	D46
17	M741		P112	

su posición relativa en el mapa. En la tabla I se indica, en la columna izquierda, esta nueva nomenclatura. Un ejemplo de la nueva denominación de los cistrones puede ser la designación de los mutantes sus A628 (Minneapolis), sus F513 (Madrid) y ts F98 (Madrid) como sus 2(628), sus 2(513) y 2(98), respectivamente.

a) Identificación de los cistrones

La identificación de cistrones entre los mutantes representantes de grupo de las colecciones existentes se llevó a cabo por experimentos de complementación cualitativa primero (Métodos 17aII), y cuantitativa después (Metodos 17b).

En la tabla II se presentan los resultados de la complementación cualitativa. Están ausentes de esta tabla aquellos mutantes cuyas características fisiológicas imposibilitaban su estudio por este método. Los símbolos (+) y (-), respectivamente, indican complementación positiva y negativa.

La complementación entre los mutantes sus 10 (302) y sus 11(542) y entre los mutantes sus 10(136) y sus 11(683), resultó dudosa, lo que se representa

Tabla II. Complementación cualitativa de los mutantes sus de Ø29 representantes de las diferentes colecciones.

MADRID MINNEAPOLIS	2 (513)	3 (91)	4 (56)	9 (422)	10 (136)	11 (542)	12 (47)	13 (55)	14 (1241)	15 (212)	16 (241)	17 (112)
2 (628)	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 (713)	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 (369)	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 (626)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 (614)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 (769)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9 (756)	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
10 (302)	+	+	+	+	—	(+ —)	+	+	+	+	+	+
11 (683)	+	+	+	+	(+ —)	—	+	+	+	+	+	+
12 (305)	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
13 (330)	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
15 (724)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
16 (300)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+

La complementación se realizó como se describe en Métodos 17aII. Los símbolos + y - representan la complementación positiva y negativa, respectivamente, el símbolo (+ -) representa la complementación que se consideró dudosa.

en esta tabla con el símbolo (+-). Este resultado se debe a la existencia de un efecto polar de la mutación sus en el cistrón 10 sobre el cistrón 11, efecto que ha sido ya descrito por Moreno y col.(49).

La tabla III muestra los valores de complementación cuantitativa entre mutantes sus y ts en los cistrones 10 y 11. El índice de complementación entre los mutantes sus 10(136) y sus 11(683) es muy bajo, lo mismo que el índice obtenido al complementar el mutante sus 10(136) y el mutante ts 11(119). Sin embargo, las complementaciones entre el mutante ts 10(54) y los mutantes sus 11(683) y ts 11(119) dan unos índices de complementación elevados, lo que indica que la presencia de la mutación sus en el cistrón 10, impide que la complementación con mutaciones sus o ts en el cistrón 11 sea efectiva.

En la tabla IV se muestran los valores de complementación intracistrónica así como algunos valores de complementación intercistrónica de los mutantes representantes de grupo de las diferentes colecciones. Está ausente de la tabla el mutante sus 14(1241) perteneciente a la colección de Moreno y col.(49) que tiene el fenotipo de lisis muy retrasada respecto a la del fago normal, con lo que la producción de fago

Tabla III. Efecto polar de la mutación *sus* en el cistrón 10 sobre el cistrón 11.

	ts10(54) (0.116)	ts11(119) (0.02)	sus10(136) (0.0125)
sus11(683) (0.108)	50.0	0.066	1.58
ts10(54) (0.116)		35.0	0.019
ts11(119) (0.02)			0.79

Los números entre paréntesis corresponden a los índices de complementación individuales. La complementación se realizó como se describe en Métodos 17b.

Tabla IV. Complementación cuantitativa de los mutantes sus y ts de Ø29 representantes de las diferentes colecciones.

	sus2(53) (0.1)	sus3(31) (0.05)	sus4(56) (0.001)	ts5(17) (0.002)	ts6(1300) (0.045)	ts7(116) (0.01)	ts8(92) (0.02)	ts9(18) (0.015)	sus10(122) (0.01)	ts10(54) (0.015)	ts11(110) (0.02)	ts12(103) (0.045)	sus13(55) (0.18)	sus13(44) (0.08)	sus13(53) (0.27)	sus14(20) (0.1)	sus16(104) (0.002)	sus17(11) (0.2)
sus1(54) (0.4)	37.0	35.0		17.0	24.0											47.5		32.5
sus2(52) (0.5)	<u>0.43</u>																	
sus3(73) (0.2)		<u>0.45</u>																
sus4(50) (0.2)			<u>0.1</u>															
ts5(20) (0.8)	39.3	57.8		<u>2.2</u>														31.4
sus6(526) (0.4)					<u>0.47</u>	20.0	11.0											
sus7(54) (0.04)					22	<u>0.02</u>	13.3	35.8	51.2									
sus8(700) (0.04)					8.5	49.2	<u>0.06</u>	45.8	69.2									
sus9(100) (0.001)								<u>0.07</u>										
sus10(102) (0.5)									<u>0.02</u>									
sus11(55) (0.1)										<u>0.07</u>								
sus12(500) (0.03)											<u>0.02</u>							
sus13(330) (0.13)													<u>0.19</u>	<u>0.7</u>	<u>1.9</u>			
sus15(72) (0.2)																<u>0.35</u>		
sus16(100) (0.002)									30.0								<u>0.004</u>	
sus17(74) (0.8)				3.0									115.0			83.0		<u>14.0</u>

Los números entre paréntesis corresponden a los índices de complementación individuales. La complementación se realizó como se describe en Métodos 17b. Los valores de complementación negativa se presentan subrayados. Los números que figuran como exponentes indican el número de experimentos realizados para obtener el valor medio que se expresa.

en la bacteria infectada puede continuar durante largo tiempo. Debido a esta peculiaridad, este mutante no puede ser utilizado en experimentos de complementación cuantitativa, ya que su índice de complementación en infección individual supera al 100% determinado por la producción de fago obtenida en la bacteria infectada por el fago normal. El fenotipo de lisis retrasada que sólo es exhibido por este mutante, junto con los resultados de la complementación cualitativa, le caracterizan como único representante del cistrón 14.

El mutante sus 1(629) perteneciente a la colección de Reilly y col. (50), presenta el fenotipo de síntesis de DNA negativa en condiciones restrictivas como se muestra en el siguiente apartado (Resultados 1b). Por ello, sólo se presentan en la tabla IV los índices de complementación cuantitativa con los mutantes representantes de grupo cuyo fenotipo era el mismo (39), y con un mutante que es capaz de sintetizar DNA en condiciones restrictivas, el mutante sus 15(212). El hecho de que estos índices de complementación sean todos ellos elevados, identifica al mutante sus 1(629) como único representante del cistrón 1.

Aquellos mutantes cuyos índices de complementación resultaron ser inferiores al 0,5%, se identificaron como pertenecientes al mismo cistrón y así se expresa en su denominación en la tabla IV. La única excepción a esta regla, son los mutantes sus 17(112) y sus 17(741), cuyo índice de complementación es 14. Este valor, anormalmente alto, es debido a los índices de complementación individuales presentados por ambos mutantes, que alcanzan valores de 12 en el caso del mutante sus 17(112) y de 0,8 en el caso del mutante sus 17(741). Teniendo en cuenta estos índices individuales elevados, que ambos mutantes presentan el mismo fenotipo de síntesis de DNA negativa en condiciones restrictivas (Resultados 1b) y su frecuencia de recombinación (Resultados 1c), ambos mutantes se identificaron como pertenecientes al mismo cistrón.

b) Síntesis de DNA en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con mutantes sus o ts de Ø29 en presencia de HPURa en condiciones restrictivas.

Ha sido demostrado previamente (39,83) que mutantes en los cistrones 2, 3, 5, 6 y 17 no sintetizan DNA en la infección, en condiciones restrictivas, de

bacterias tratadas con HP³Ura.

La figura 7A muestra que en B. subtilis 110NA su⁻ infectada con el fago normal con los mutantes ts 5(17) y ts 5(219) a 42°C en presencia de HP³Ura, como se indicó en Métodos 18 bis, tan sólo el fago normal es capaz de desarrollarse. La figura 7B, muestra la incorporación de timidina -H³ a lo largo del tiempo en los cultivos infectados. Como puede observarse, el nivel de incorporación de radioactividad en los cultivos infectados por los mutantes ts 5(17) y ts 5(219) no supera el obtenido con el cultivo control sin infectar.

En la figura 8A puede apreciarse que no existe desarrollo de fago en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con los mutantes sus 1(629), sus 17(112) y sus 17(741), e incubado a 42°C (Métodos 19) frente al desarrollo de fago que tiene lugar cuando la bacteria es infectada en las mismas condiciones por el fago normal.

La figura 8B muestra la incorporación de radioactividad en los cultivos a distintos tiempos después de la infección. Como puede observarse, el nivel de incorporación de timidina -H³ en los cultivos infectados por los mutantes sus 1(629) y sus 17(112), no supera

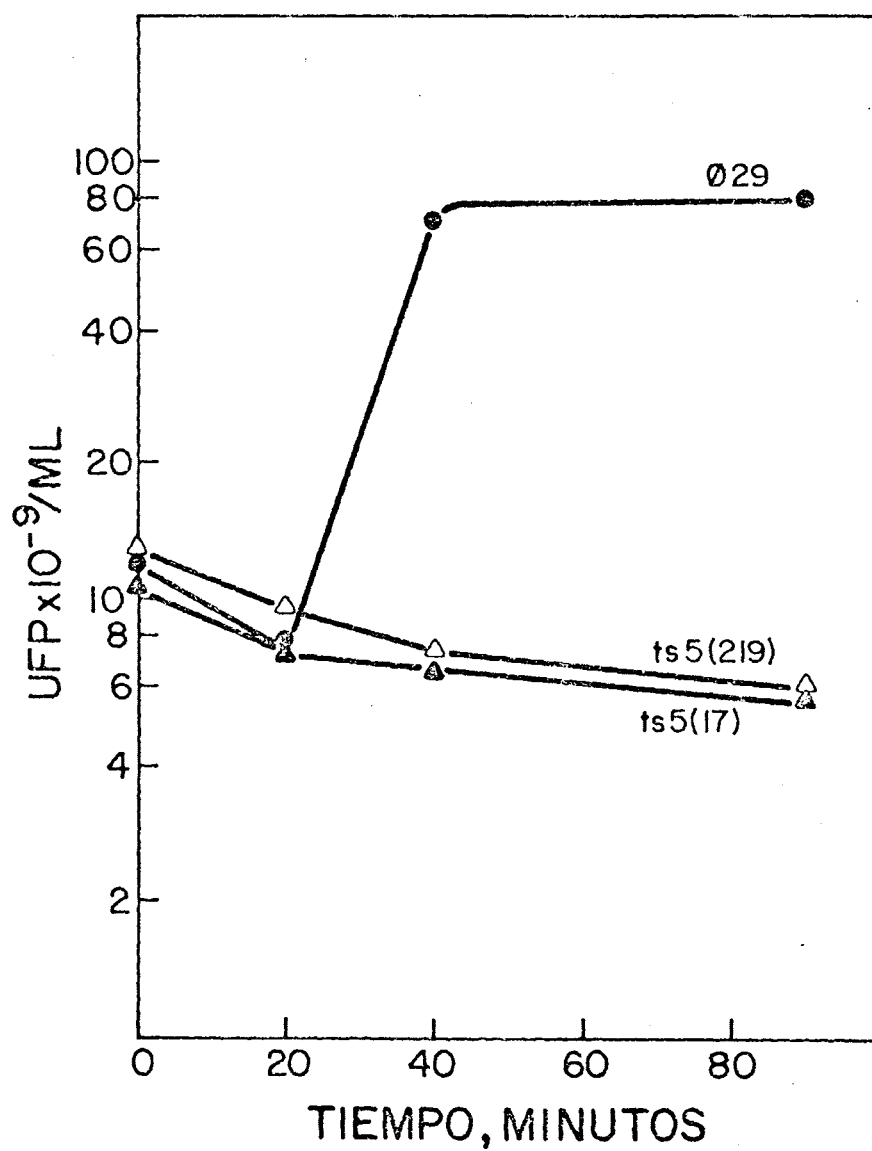


Figura 7A. Desarrollo de fago en *B. subtilis* 110NA infectado con ø29 normal o con los mutantes ts 5(219) y ts 5(17).

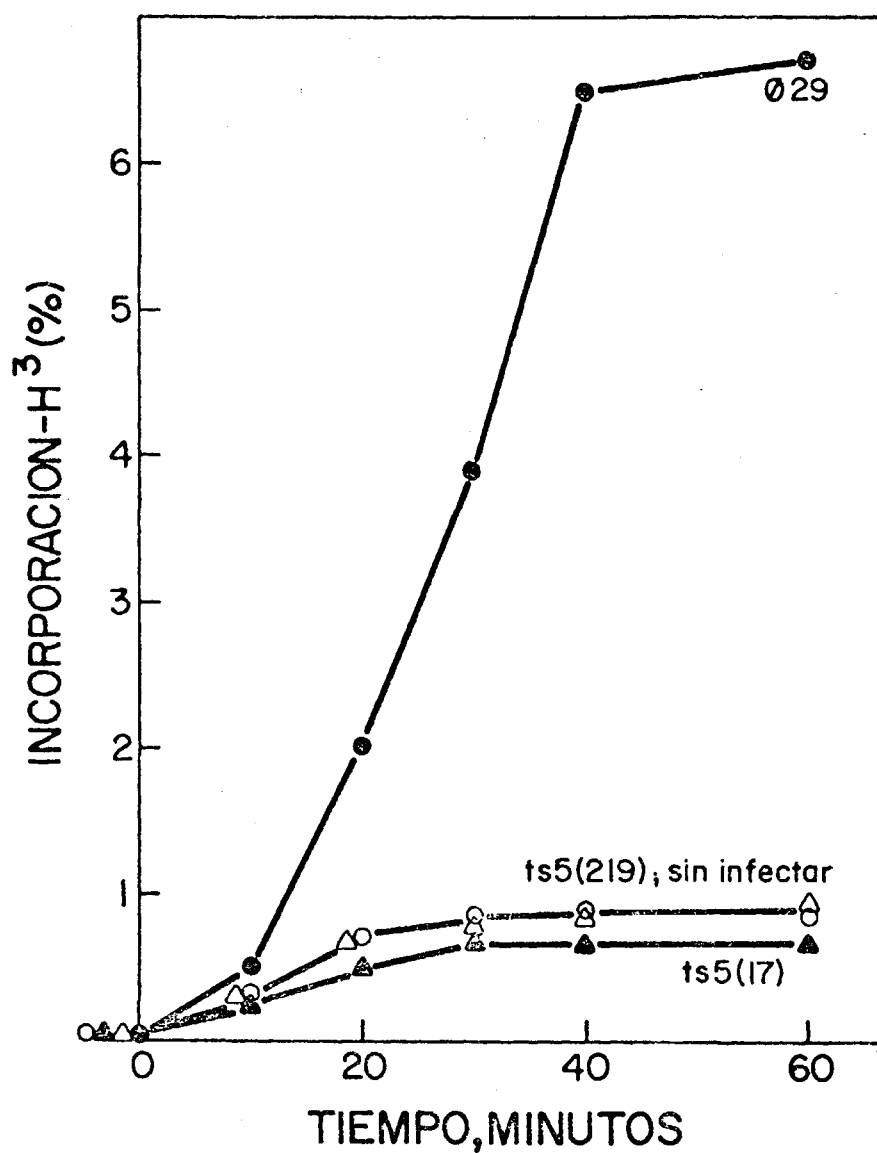


Figura 7B. Incorporación de timidina -H³ en *B. subtilis* 110NA infectado con Ø29 normal o con los mutantes ts 5(219) y ts 5(17).

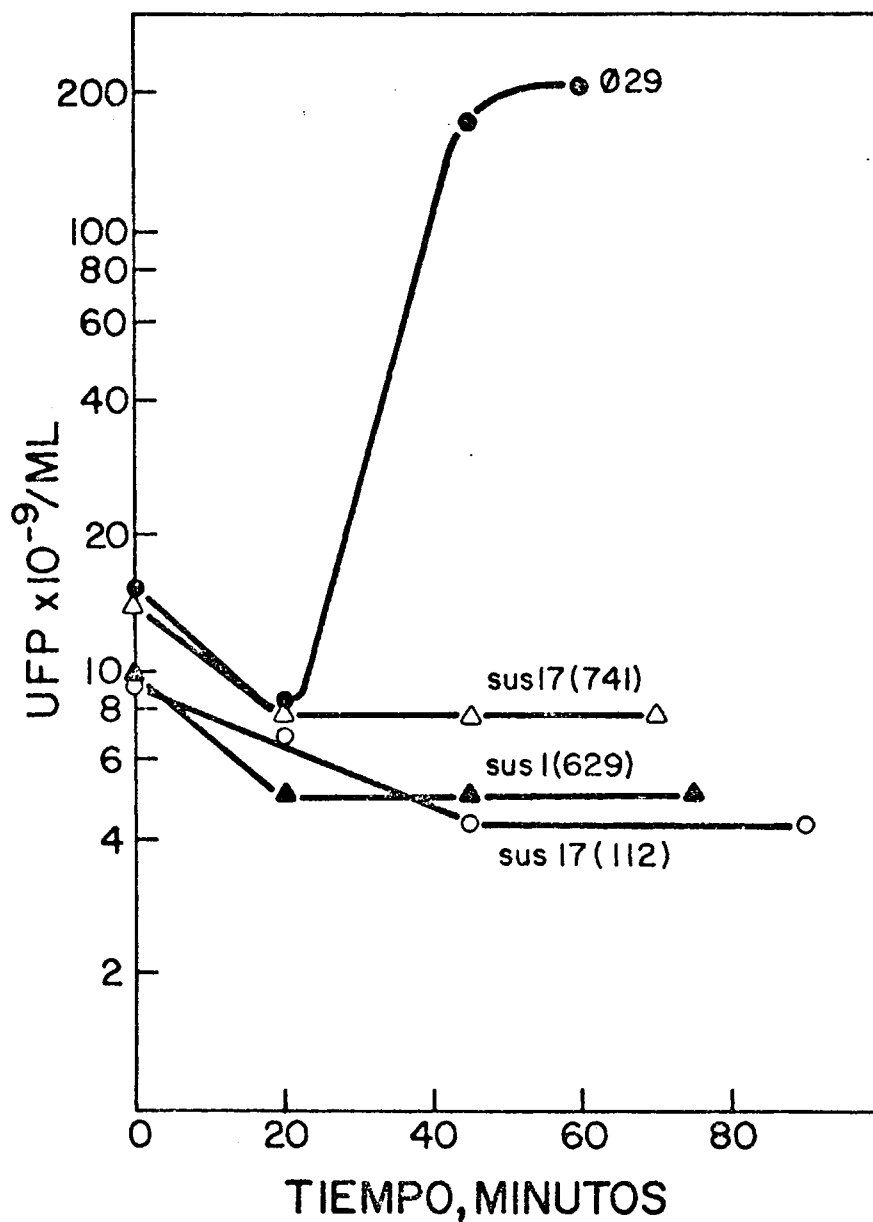


Figura 8A. Desarrollo de fago en *B. subtilis* 110NA su⁻ infectado con ø29 normal o con los mutantes sus 17(741), sus 17(112) o sus 1(629).

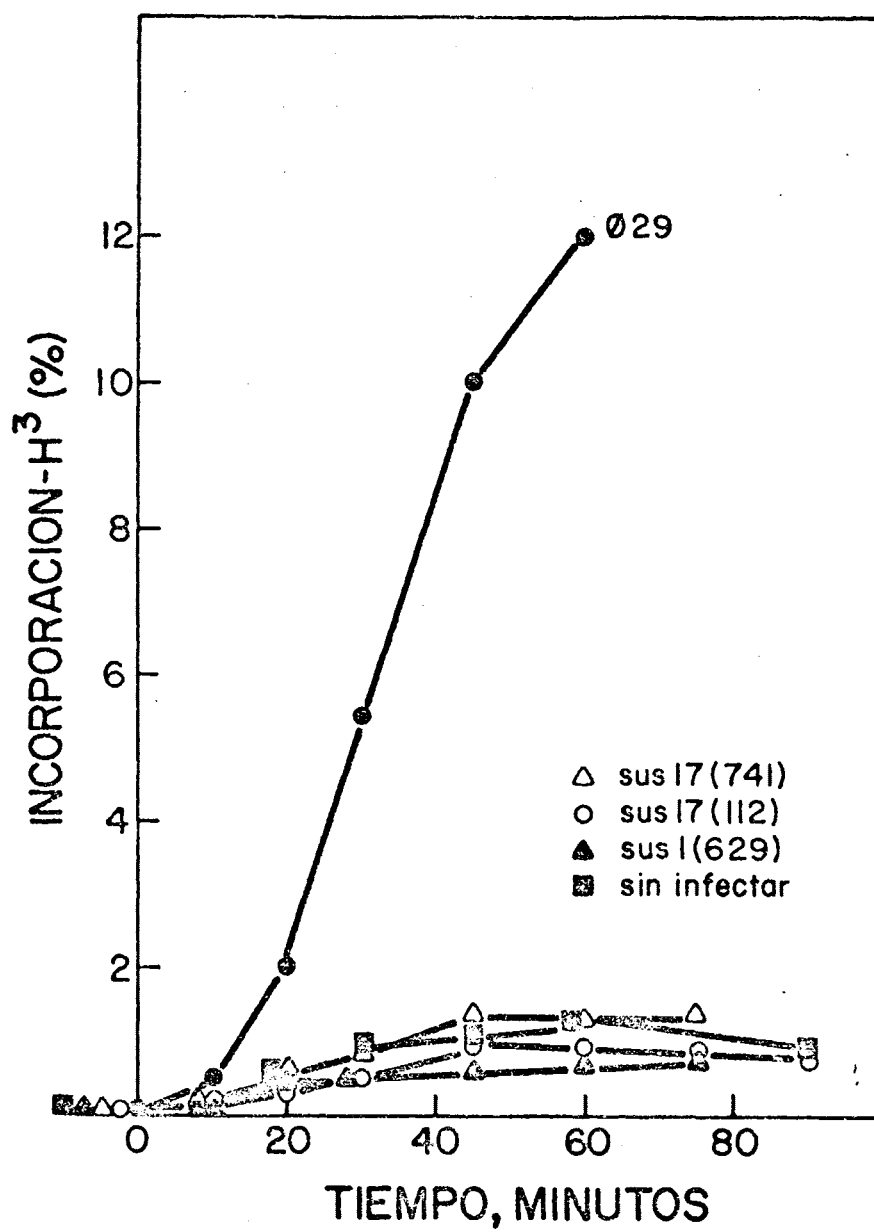


Figura 8B. Incorporación de timidina -H³ en *B. subtilis* 110NA su⁻ infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 17(741), sus 17(112) o sus 1(629).

al del cultivo control sin infectar, mientras que se puede apreciar un ligero aumento en el nivel de incorporación del isótopo en el cultivo infectado con el mutante sus 17(741), aumento que no llega a duplicar el nivel de control sin infectar y, que es inferior al 0,5% de la incorporación que tiene lugar en el cultivo infectado por el fago normal, una vez sustraída la incorporación del control no infectado en ambos casos.

- c) Ordenación de los representantes de las diferentes colecciones de mutantes sus y ts de Ø29 en un mapa genético lineal.

En la figura 9 se muestra el mapa genético lineal de Ø29 establecido por Moreno y col. (49) y que ha sido utilizado como base para la ordenación de los mutantes sus y ts de Ø29 pertenecientes a las colecciones de Reilly y col. (50) y Hagen y col. (43). La ordenación se llevó a cabo por experimentos de recombinación que normalmente fueron cruces de dos factores. Los cruces de tres factores sólo se realizaron cuando el orden relativo de dos marcadores no se pudo establecer con claridad por cruces de dos factores.

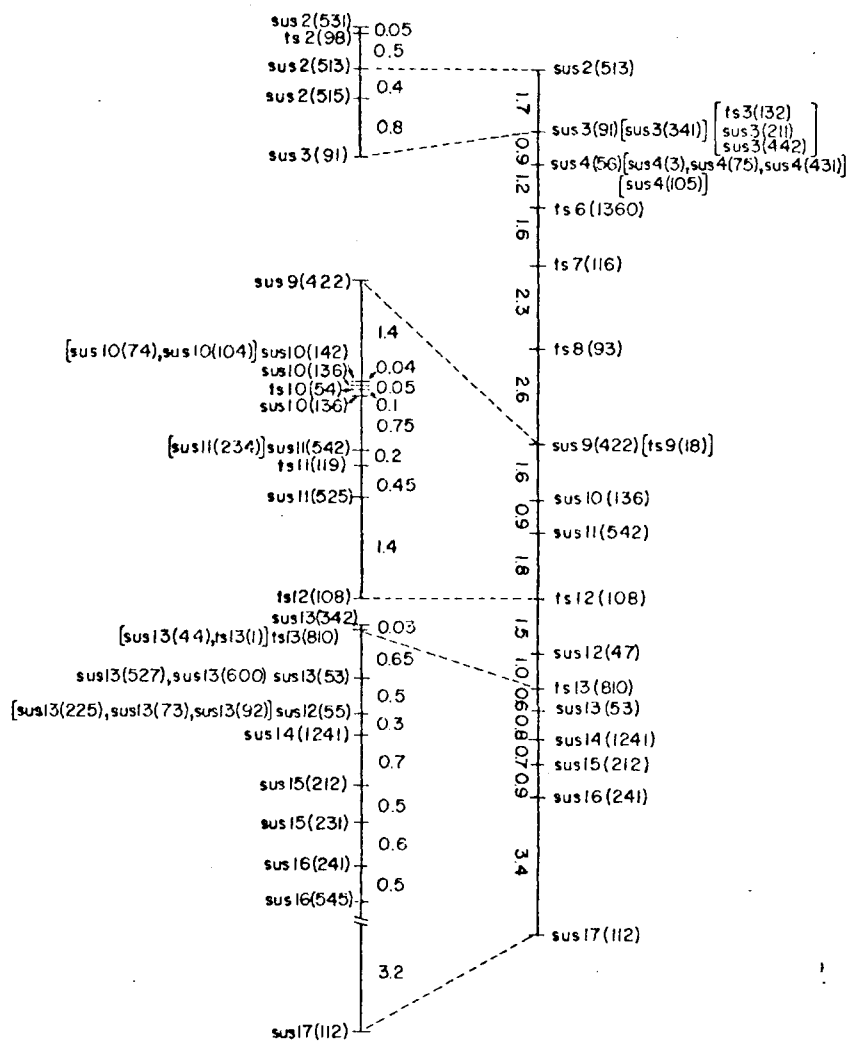


Figura 9. Mapa genético de Ø29 obtenido por Moreno y col. (49).

I). Cruces de dos factores. Se realizaron como se ha descrito en Métodos 18a, utilizándose como estirpe supresora B. subtilis MO-99 su⁺³ y siendo 30°C la temperatura a la que se incubaron los cultivos.

En la tabla V se muestran los porcentajes de recombinación entre los mutantes sus y ts de Ø29 pertenecientes a las diferentes colecciones. Como puede observarse, la posición de los representantes de grupo del mismo cistrón pero de colecciones de diferente procedencia, prácticamente coincide en la mayor parte de los casos. Así ocurre con los mutantes sus 3(91) y sus 3(713), sus 4(56) y sus 4(369), ts 5(17) y ts 5(219), ts 7(116) y sus 7(614), sus 10(136) y sus 10(302), sus 11(542) y sus 11(683), sus 13(55) y sus 13(330), sus 15(212) y sus 15(724), sus 16(241) y sus 16(300), sus 17(112) y sus 17(741), siendo en todos ellos el índice de recombinación igual o inferior a 0,1.

Los dos representantes del cistrón 2, mutantes sus 2(513) y sus 2(628) se localizan a una distancia genética de 0,5 unidades de recombinación entre ambos. Como puede verse en la figura 9, a ambos lados del mutante sus 2(513) se localizan los mutantes ts 2(98) y sus 2(515) a distancias de 0,5 y 0,4 respectivamente, lo que indica de nuevo una coincidencia.

Tabla V. Porcentajes de recombinación entre los mutantes sus y ts de Ø29 representantes de las diferentes colecciones.

TIPO	sus	sus	sus	sus	sus	sus	ts	sus	ts	sus	sus	ts	sus	sus	sus	TIPO	sus	sus	sus	sus	sus	sus	sus	sus	sus	sus	
CISTRON	1	2	3	3	4	4	5	6	7	7	8	8	9	9	10	CISTRON	11	11	12	12	12	13	13	13	15	16	17
MUTANTE	629	628	91	713	56	369	219	626	116	614	769	93	422	756	302	MUTANTE	683	525	305	47	662	44	55	330	212	241	112
sus 2(513)	0.7 ²	0.5	2.0					1.8 ²	6.6							sus 11(542)	<0.01										
sus 3(91)	1.3 ²			0.1 ²	1.1	1.4	0.6 ²	3.6			5.1					sus 11(683)	0.8	3.6 ⁷		5.6 ⁷							
sus 3(713)							0.5 ²									ts 12(108)			1.0 ²	1.8 ³		2.9 ³					
sus 4(56)							0.05 ²			2.2 ²	3.1 ²					sus 12(305)				1.1 ²	1.0 ⁶	2.7 ²					
ts 5(17)							0.05 ²									sus 12(47)						1.9					
sus 6(626)							1.6		2.1 ²	1.4 ³	3.0 ³	3.4	13.8			sus 12(662)							2.7				
ts 7(116)										0.15 ²	1.0 ³	2.1 ²	5.1			sus 13(44)						1.2	1.0				
sus 7(614)											1.0 ³	2.2 ²	3.7			sus 13(53)						0.9	0.8				
sus 8(769)											0.8 ²	3.7 ²	4.6 ⁷			sus 13(55)							<0.01				
ts 8(93)												2.6				sus 15(212)								0.9			
ts 9(18)												0.2 ²	0.6 ²			sus 15(724)								0.09	1.0		
sus 9(422)														0.34 ⁴	1.5 ²	sus 16(300)									0.07		
sus 9(756)															1.2	sus 17(741)										0.06	
sus 10(136)															0.06 ²												

La bacteria utilizada como estirpe supresora fue *B. subtilis* MO-99 su ³. Los experimentos de recombinación se realizaron como se describe en Métodos 17b. Los valores de complementación negativa se presentan subrayados. Los números que figuran como exponentes indican el número de experimentos realizados para obtener el valor medio que se expresa.

en la posición del mutante sus 2(628), bien con el sus 2(515) o con el ts 2(98).

Los mutantes sus 6(626), sus 7(614), ts 7(116), sus 8 (769) y ts 8(93) quedan localizados sin ambigüedad en el mapa genético como se deduce de la tabla V y de la representación de la región comprendida entre las mutaciones sus 3(91) y sus 9(422) que se muestra en la figura 10.

El mutante sus 12(305) queda localizado entre los representantes ts 12(108) y sus 12(47) a distancias de 1,0 y 1,1 respectivamente.

El mutante sus 1(629) se localiza a una distancia de 0,7 unidades de recombinación del representante sus 2(513) y define el extremo izquierdo del mapa genético como indican los cruces de tres factores realizados por el Dr. B.E. Reilly (95).

El mutante sus 14(1241) ha sido localizado genéticamente por el Dr. F. Moreno (49).

II). Cruces de tres factores. La única ambigüedad en la ordenación de los mutantes representantes de grupo se produjo en el caso de los mutantes sus 9(422) y sus 9(756), distantes entre sí 0,3 unidades de recombinación y distancias del mutante sus 10(136),

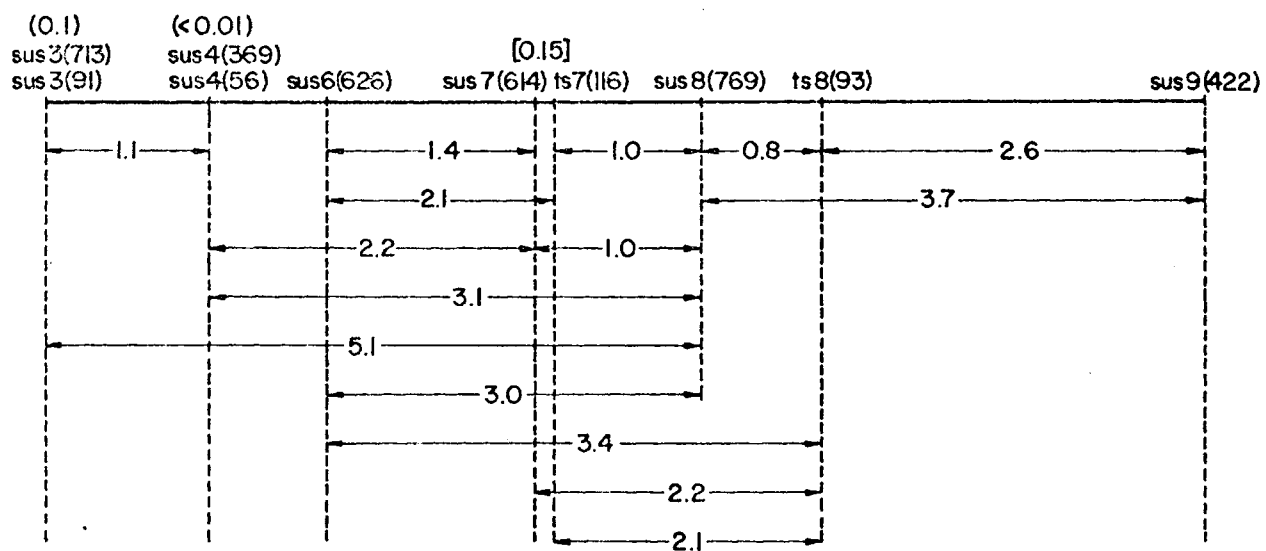


Figura 10. Mapa genético parcial de Ø29. Cistrones 3 a 9.

1,5 y 1,2 unidades, respectivamente, valores que impedían resolver cuál de los mutantes en el cistrón 9 estaba realmente más próximo al siguiente cistrón.

Para aclarar este punto, se construyeron los dobles mutantes sus 9(422)-ts 12(108) y sus 9(756)-ts 12(108), como se ha indicado en Métodos 20 y se realizaron los cruces: 1) sus 9(422)-ts 12(108) x sus 9(756) y 2) sus 9(756)-ts 12(108) x sus 9(422). Los resultados se presentan en la tabla VI. De la relación existente en la progenie de los cruces entre recombinantes normales y recombinantes que conservan el carácter termosensible, puede deducirse el orden relativo de los dos mutantes en el cistrón 9, respecto del mutante termosensible en el cistrón 12. De acuerdo con esta relación, el mutante sus 9(756) se localiza a la derecha del mutante sus 9(422).

Los resultados de los experimentos de complementación (Resultados 1a) apoyados en los estudios de la síntesis de DNA de diversos mutantes en condiciones restrictivas (Resultados 1b), permiten clasificar los mutantes sus y ts de Ø29 en 17 cistrones diferentes. Los experimentos de cruces de dos y tres factores han permitido ordenar sin ambigüedad los 17 cistrones y colocar los

Tabla VI. Cruces de tres factores de mutantes sus y ts de Ø29.

<u>Cruce nº</u>	<u>Tipo de Cruce</u>	<u>Relación</u>	<u>Valor %^a</u>	<u>Orden relativo</u>
1	sus9(422)ts12(108) x sus9(756)	+++ / ts ++	26.4(197/153)	sus9(422) sus9(756) ts12(108)
2	sus9(756)ts12(108) x sus9(422)	+++ / ts ++	87.5(141/168)	

Los cruces de tres factores se realizaron como se describe en Métodos 18b..

^a. Los números entre paréntesis indican el número de unidades formadoras de placa contadas en cada caso.

mutantes sus y ts de Ø29 en un mapa genético lineal de 24,4 unidades de recombinación totales (Figura 11).

2) MUTANTES SUS DE Ø29 OBTENIDOS POR MUTAGENESIS CON LUZ UV.

De los 6 cultivos mutagenizados probados, se obtuvieron 6 mutantes de origen independiente. La tabla VII muestra la complementación cualitativa efectuada entre ellos, resultando ser todos del mismo cistrón. La tabla VIII muestra la complementación cualitativa de dos de ellos, tomados en representación, con todos los representantes de los grupos de complementación ya establecidos (49). Ambos mutantes fueron claros en su complementación negativa con el representante sus 11 (542), pero dudosos respecto al representante sus 10 (74).

Los resultados de la complementación cuantitativa del representante UV-403 (obtenido por este método) con los representantes de grupo sus 10(74) y sus 11(542), se muestran en la tabla IX, donde se representan también los controles de complementación positiva con los mutantes sus 12(47) y sus 15(212). Como puede observarse, la complementación con el mutante sus 10(74) es débilmente positiva (superior al 0,5%), siendo claramente

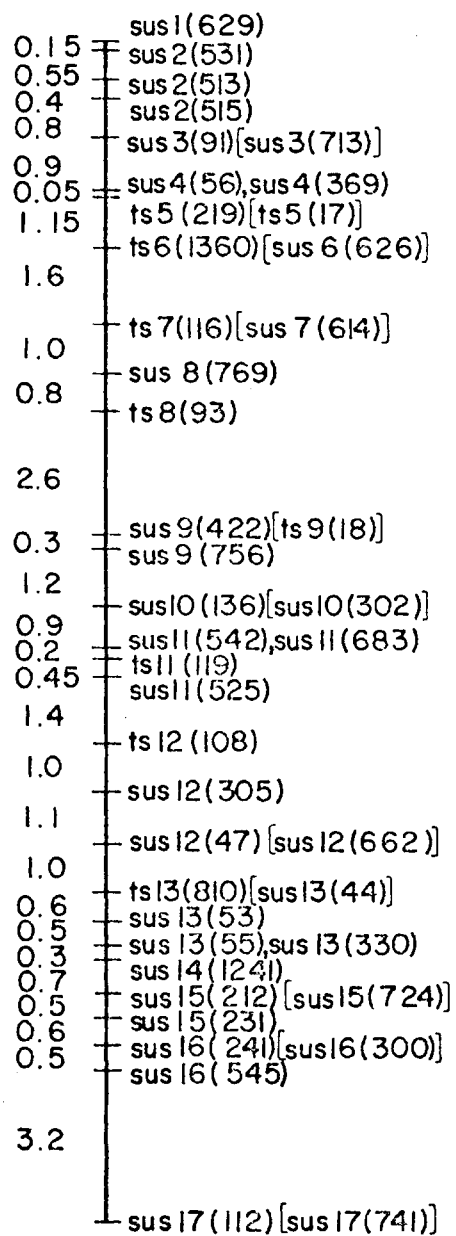


Figura 11. Mapa genético de Ø29.

Tabla VII. Complementación cualitativa de los mutantes sus obtenidos por irradiación con luz ultravioleta.

	UV-302	UV-304	UV-403	UV-601	UV-602
UV-101	-	-	-	-	-
UV-302		-	-	-	-
UV-304			-	-	-
UV-403				-	-
UV-601					-

La complementación se llevó a cabo como se describe en Métodos 17aI.
El símbolo - representa la complementación negativa.

Tabla VIII. Complementación cualitativa de dos mutantes sus obtenidos por irradiación con luz ultravioleta y los mutantes sus representantes de los otros grupos de complementación.

	2(513)	3(91)	4(56)	9(422)	10(74)	11(542)	12(47)	13(55)	14(1241)	15(212)	16(241)	17(112)
UV-304	+	+	+	+	(<u>±</u>)	-	+	+	+	+	+	+
UV-403	+	+	+	+	(<u>±</u>)	-	+	+	+	+	+	+

La complementación se llevó a cabo como se describe en Métodos 17aI.
 Los símbolos + y - representan la complementación positiva y negativa, respectivamente; el símbolo (±) representa la complementación que se consideró dudosa.

Tabla IX. Complementación cuantitativa del mutante
UV-403 y representantes sus de los cistrones
10, 11, 12 y 15.

	10 (74) (0,0057)	11 (542) (0,022)	12 (47) (0,16)	15 (212) (0,1)
UV-403 (0,0017)	0,8	0,028	25,0	25,0

Los números indicados entre paréntesis corresponden a los índices de complementación individuales. La complementación se efectuó como se describe en Métodos 17b.

negativa con el mutante sus 11(542).

La débil complementación existente entre los mutantes ts 10(74) y sus 11(542) ha sido ya observada y estudiada por Moreno y col.(49), debiéndose a la existencia de un efecto polar de la mutación sus en el cistrón 10 en la expresión del cistrón 11, como se ha demostrado anteriormente (Resultados 1a).

Se concluye por tanto, que todos los mutantes sus, obtenidos por irradiación con luz UV, están localizados en el cistrón 11.

3) AISLAMIENTO DE B. SUBTILIS MO-101-P SPOA⁻ THR⁻
(MET⁻)⁺ SU⁺⁴⁴

De la mutagénesis de B. subtilis 168 MO-101-P spoA⁻ met⁻ thr⁻ su⁻ con EMS (Métodos 8), se aislaron 148 revertientes por supresión de requerimientos, de los cuales 91 mostraron su capacidad de crecimiento en ausencia de treonina, 26 fueron capaces de crecer en ausencia de metionina y 31 podían crecer en ausencia de ambos aminoácidos.

En la tabla X, se muestran los revertientes seleccionados, entre los 148 aislados, por su capacidad de suprimir a los mutantes sus de Ø29 que se habían

Tabla X. Supresión de los mutantes sus de Ø29 por distintos revertientes de B. subtilis obtenidos por tratamiento con EMS.

Revertiente no.	Fenotipo	Mutantes suprimidos	Mutantes no suprimidos
1	(met ⁻ thr) ⁻	Todos los probados	Ninguno
3	"	"	"
10	"	"	"
12	"	"	"
17	"	"	"
26	"	"	"
29	"	"	"
30	"	"	"
34	"	"	"
36	"	"	"
40	"	"	"
44	(met ⁻) ⁺ thr ⁻	Todos menos sus12(47)	sus12(47)
126	"	Todos los probados	Ninguno
129	"	"	"
130	"	"	"
135	"	"	"
144	"	"	"
45	met ⁻ (thr ⁻) ⁺	"	"
67	"	"	"
69	"	"	"
71	"	"	"
74	"	"	"
120	"	"	"
150	"	"	"

La tabla agrupa los resultados de la selección en sólido y las comprobaciones efectuadas por plaqueo directo. Los mutantes sus utilizados fueron: 2(513), 3(91), 4(56), 9(422), 10(74), 11(542), 13(53), 16(241), 11(101), 11(302), 11(304), 11(403), 11(601), 11(602), 3(422), 13(600), 2(531), 12(47), 3(341), 15(212), 14(1241), 13(55).

obtenido utilizando como bacteria supresora B. subtilis MO-99 su^{+3} (49). Como puede verse, de los 91 revertientes capaces de crecer en ausencia de treonina, sólo 7 de ellos fueron capaces de suprimir mutaciones su , permitiendo el desarrollo de todos los mutantes su de Ø29 utilizados para la selección. De los 31 revertientes que podían crecer en ausencia de metionina y treonina, 11 permitían el desarrollo de todos los mutantes su de Ø29 utilizados, mostrando así su capacidad supresora. De los 26 revertientes capaces de crecer en ausencia de metionina, sólo 6 fueron capaces de suprimir mutaciones su , permitiendo 5 de ellos, el desarrollo de todos los mutantes su de Ø29 utilizados. Tan sólo un revertiente de estos 6, el revertiente número 44, no permitió el desarrollo del mutante su 12(47) de Ø29. Este revertiente, B. subtilis 168 MO-101-P $spoA^{-}thr^{-}(met^{-})^{+}su^{+44}$ fué seleccionado para estudiar su eficiencia de supresión.

En la tabla XI se muestran las eficiencias de plaqueo relativas de diversos mutantes su de Ø29 comparando entre sí B. subtilis MO-99 su^{+3} y B. subtilis MO-101-P su^{+44} . Como puede observarse, existen diferencias en las eficiencias de plaqueo en una u otra estirpe entre mutantes pertenecientes al mismo cistrón, es

Tabla XI. Eficiencia de plaqueo de distintos mutantes
sus de Ø29 sobre las estirpes supresora MO-
99 su⁺³ y MO-101-Psu⁺⁴⁴.

Mutante	MO-101-P su ⁺⁴⁴	MO-99 su ⁺³
sus ⁺	1,0	1,0
2(513)	0,9	1,0
3(91)	1,0	1,0
3(442)	0,6	1,0
4(56)	1,0	1,0
9(422)	1,0	1,0
10(136)	1,0	1,0
10(138)	1,0	0,2
10(74)	1,0	1,0
11(542)	1,0	1,0
11(525)	0,8	1,0
12(47)	10 ⁻⁵	1,0
13(53)	1,0	0,5
13(600)	1,0	1,0
14(1241)	1,0	1,0
15(212)	0,9	1,0
15(345)	1,0	1,0
16(241)	1,0	1,0
16(545)	0,6	1,0
17(112)	1,0	1,0

Las eficiencias han sido calculadas respecto a la
eficiencia 1,0 que aparece en una u otra columna pa-
ra el mutante de que se trata en cada caso.

decir, las diferencias dependen del mutante utilizado y no del cistrón al que pertenece, lo que sugiere que el aminoácido insertado como resultado de la supresión es más o menos funcional en dependencia de la localización de la mutación. La eficiencia de plaqueo del mutante sus 12(47) en B. subtilis su⁺⁴⁴ es la correspondiente a la frecuencia de reversión de este mutante.

La tabla XII muestra la producción relativa de fago en B. subtilis MO-99 su⁺³ y B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ infectadas con los mutantes sus de ø29 representantes de grupo de la colección de Moreno y col. (49) y referida como porcentaje de la producción de fago en la infección de ambas estirpes supresoras con ø29 normal. La producción de fago en B. subtilis su⁺⁴⁴ infectada con el mutante sus 12(47) alcanza tan solo un valor de un 0,5%. indicativo de la ausencia de desarrollo del mutante en la estirpe supresora.

4) PROTEINAS INDUCIDAS POR INFECCION DE B. SUBTILIS MO-101-P SU⁻ Y SU⁺⁴⁴ CON LOS MUTANTES SUS 15(212) Y SUS 12(47) DE ø29.

La imposibilidad de desarrollo del mutante sus 12(47) en B. subtilis su⁺⁴⁴ podría deberse a que

Tabla XII. Producción relativa de fago en B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ y B. subtilis MO-99 su⁺³ infectado con mutantes sus de Ø29 a 30°C.

Mutante	% de sus en su ⁺⁴⁴ ^a	% de sus en su ⁺³
sus+	100	100
2(513)	99	70
3(91)	108	65
4(56)	90	75
9(422)	21	95
10(136)	15	72
11(542)	39	55
12(47)	0,05	22
13(53)	87	142
14(1241)	188	168
15(212)	25	44
16(241)	25	28
17(112)	27	48

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ y B. subtilis MO-99 su⁺³ creciendo en medio LB suplementado se infectaron en fase logarítmica con Ø29 normal o con los diferentes mutantes sus que se indican a multiplicidad 10. Los cultivos infectados se procesaron como se indica en complementación cuantitativa.

^a Los valores indicados son la media de 2 experimentos.

este supresor no reconociera el triplete sin sentido presente en el mutante sus 12(47), o a que, aunque el triplete sin sentido fuera reconocido por el supresor, el aminoácido insertado por éste no permitiera la funcionalidad de la proteína producto del gen 12. Para decidir entre estas dos posibilidades, las proteínas sintetizadas en bacterias irradiadas con luz UV e infectadas con el mutante sus 12(47) y con el mutante sus 15(212), llevado como control positivo, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida.

a) Proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora

En la figura 12 se muestra el desarrollo de fago que tiene lugar después de la infección de B. subtilis MO-101-P su⁻, irradiado durante 10,5 minutos como se ha descrito (Métodos 10), con el fago normal y con los mutantes sus 15(212) y sus 12(47). Como puede apreciarse, a diferencia del fago normal, ninguno de los dos mutantes puede desarrollarse en la estirpe no supresora.

Para estudiar la síntesis de los polipéptidos inducidos por los mutantes sus 15(212) y sus 12(47) en la infección de B. subtilis MO-101-P su⁻, irradiado, se mezclaron alícuotas de los cultivos infectados con

Ø29 normal marcados con leucina- H^3 del minuto 15 al 60 después de la infección y con uno u otro de los mutantes (marcados con leu- C^{14} al mismo tiempo después de infección), se lisaron y se disociaron las proteínas para someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida en un sistema de pH discontinuo (Métodos 11a).

Para calcular la radioactividad específica de cada mutante en la bacteria infectada, se mezclaron alícuotas de cultivos infectados por uno y otro mutante (marcados con leu- C^{14} del minuto 15 al 60 después de la infección) y de cultivos sin infectar (marcados con leu- H^3 al mismo tiempo), se lisaron y se disociaron las proteínas para someterlas al mismo tipo de análisis electroforético (Métodos 11a).

La figura 13 muestra los resultados de la co-electroforesis de las proteínas sintetizadas después de infectar B. subtilis MO-101-P su^- , con el mutante sus 15(212) y con el fago normal. Como se ha descrito previamente en el caso de la estirpe B. subtilis 110NA su^- (47), puede observarse la ausencia de síntesis de la proteína 11, que ha sido llamada también pN (96) y ahora se denomina p15 (39), en bacterias infectadas por el mutante y que está presente en bacterias infectadas por el fago normal. La figura 14 muestra la

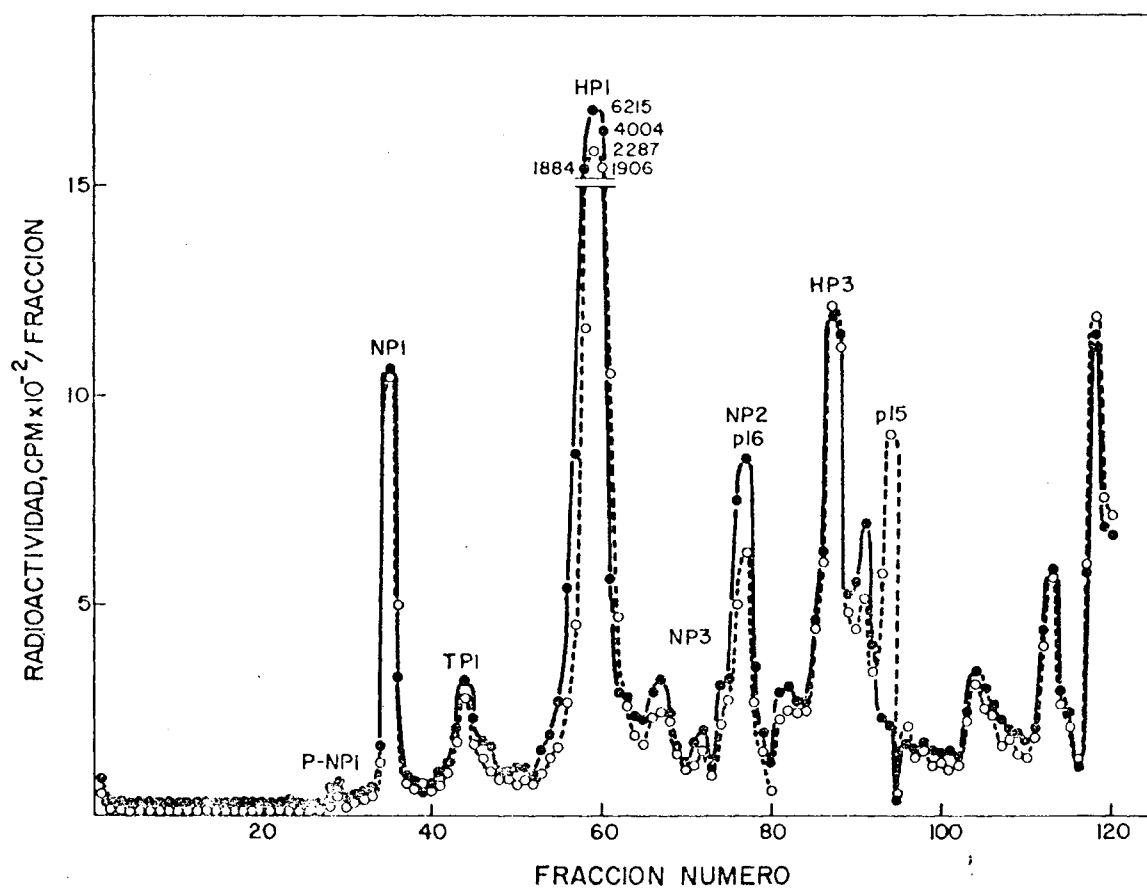


Figura 13. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212) o con Ø29 normal.

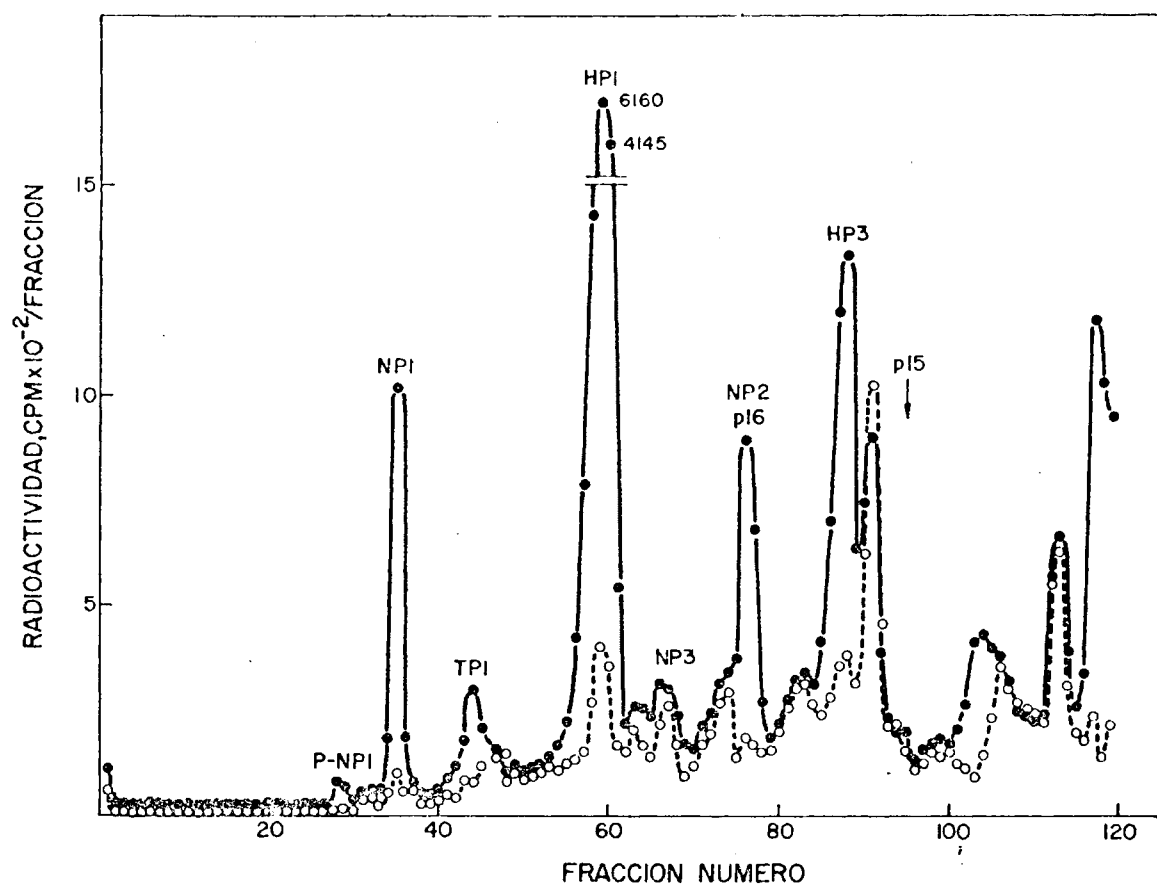


Figura 14. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212) o sin infectar.

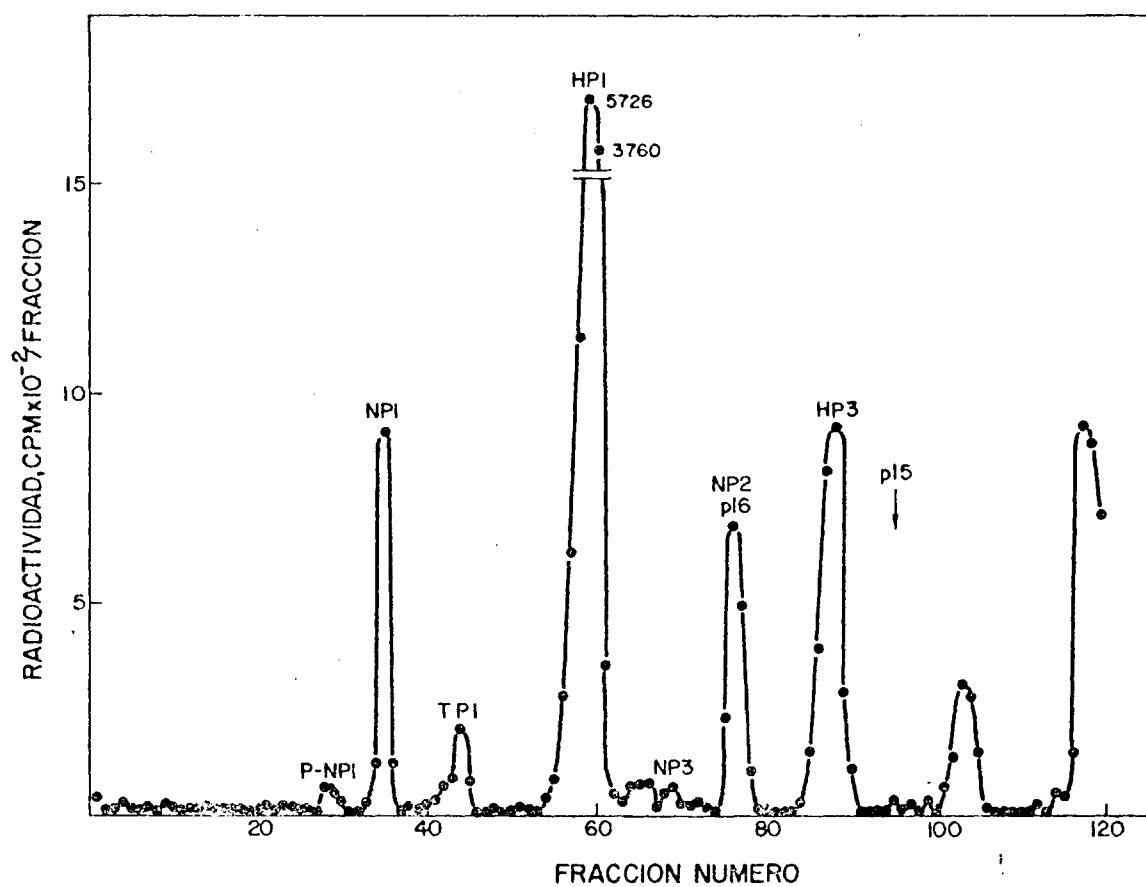


Figura 15. Radioactividad específica del mutante sus 15(212) en B. subtilis su⁻.

coelectroforesis de las proteínas sintetizadas después de la infección de la estirpe no supresora por el mutante sus 15(212) y en la bacteria sin infectar. La figura 15 muestra la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada calculada siguiendo el método de Mayol y Sinsheimer (97), considerando que la radioactividad de C^{14} , debida a las proteínas inducidas por el mutante después de la infección, es igual a la radioactividad de C^{14} obtenida en el contador, menos la relación mínima C^{14}/H^3 determinada en las fracciones del gel, multiplicada por la radioactividad de H^3 obtenida en el contador para cada fracción. De esta manera, se revela la radioactividad específica debida a la infección poniéndose más claramente de manifiesto la ausencia de síntesis de la proteína p15.

La figura 16 muestra los resultados de la coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe no supresora por la infección con el mutante sus 12 (47) y con el fago normal. En bacterias infectadas con el mutante puede observarse la ausencia de síntesis de la proteína NP1, que forma los apéndices del cuello del fago (26,27), y la aparición de un fragmento de menor peso molecular (aproximadamente 75.000) designado como NP1*, de acuerdo con anteriores resultados

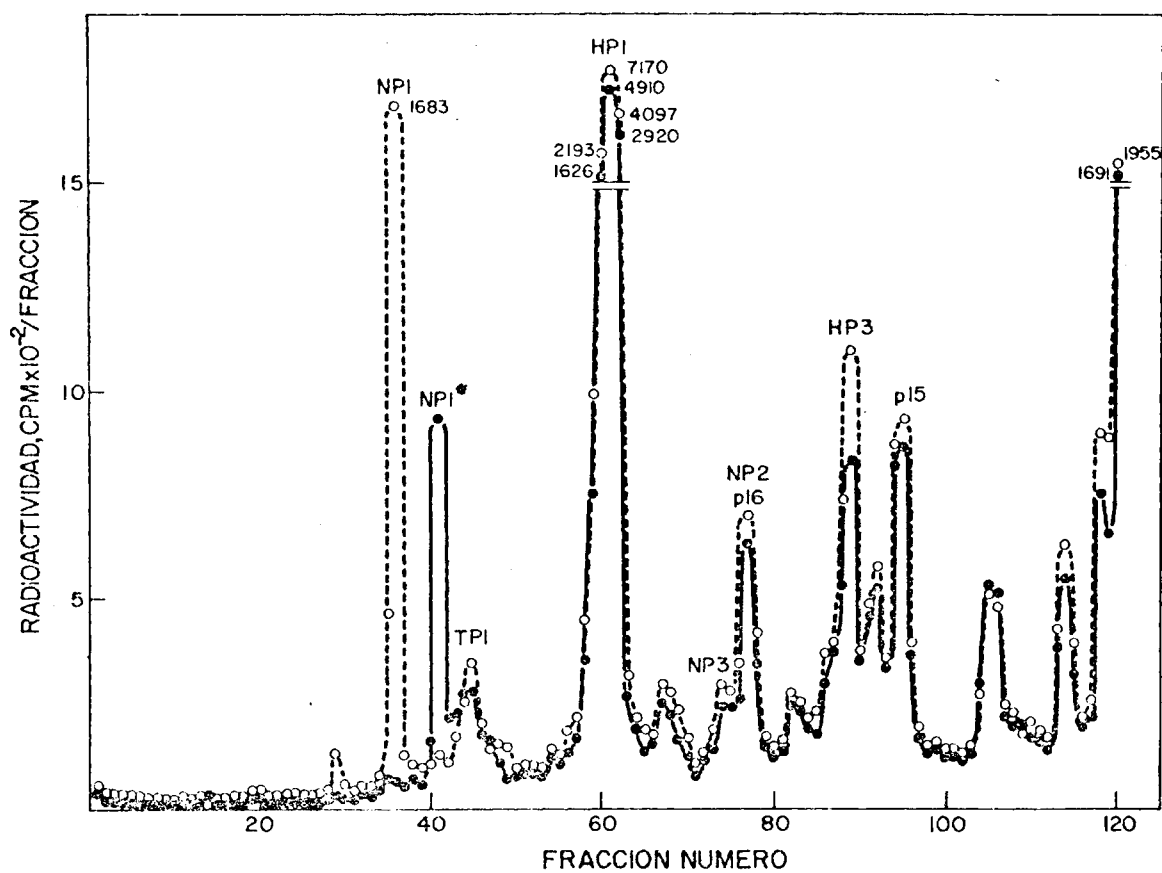


Figura 16. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 12(47) o con ø29 normal.

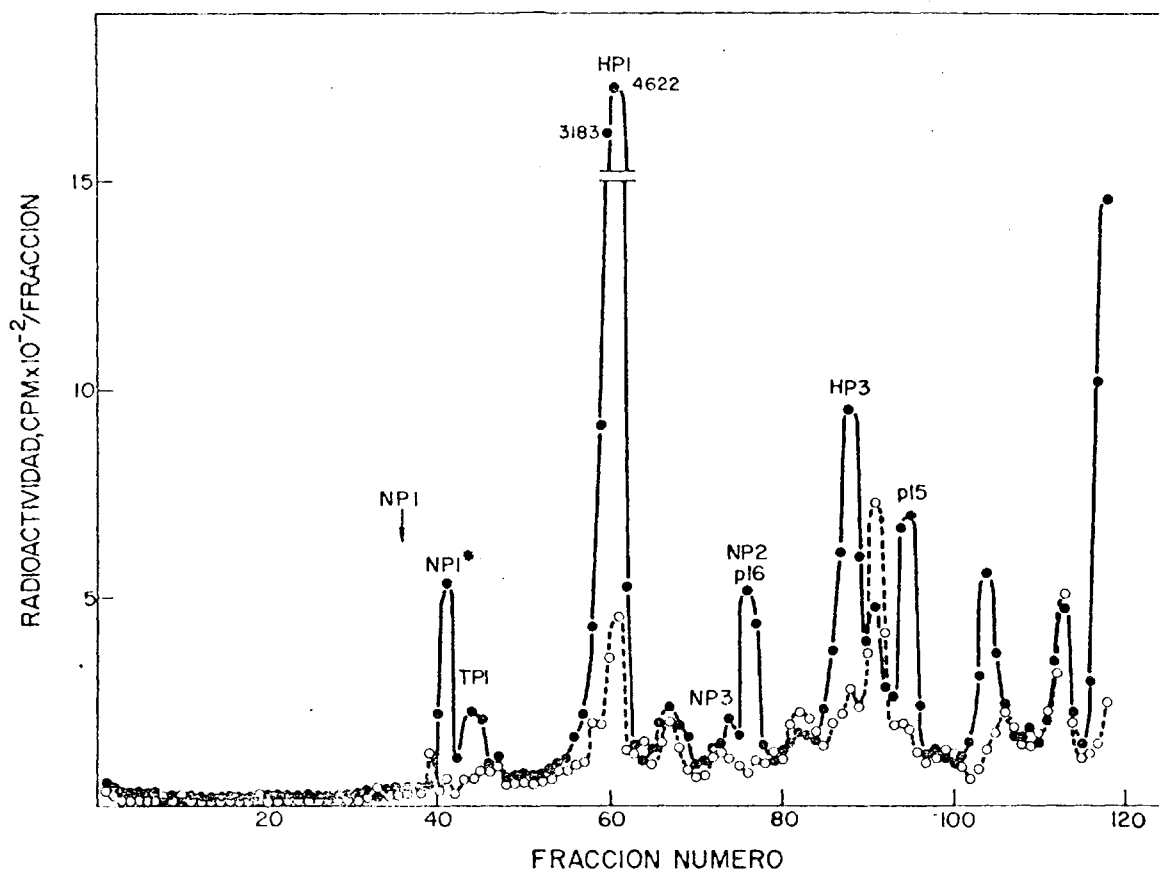


Figura 17. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁻ irradiado con el mutante sus 12(47) o sin infectar.

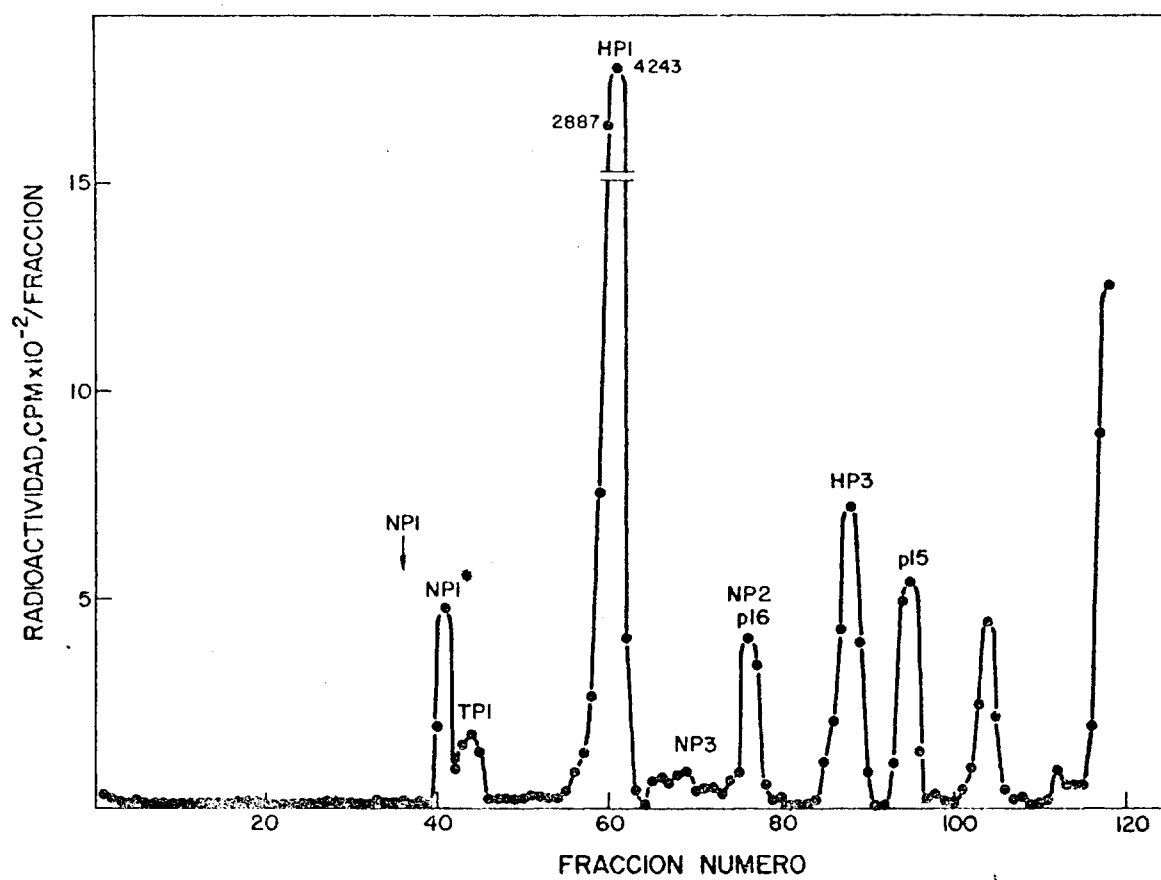


Figura 18. Radioactividad específica del mutante *sus* 12(47) en *B. subtilis* *su*⁻.

(47), que por análisis de péptidos tripticos mostró estar relacionado con la proteína NP1 y con su precursor P-NP1 (41).

La figura 17 muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora infectada por el mutante sus 12 (47) y en la bacteria sin infectar. En la figura 18 se representa la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada calculada como se ha descrito anteriormente (97), poniéndose de manifiesto claramente la ausencia de síntesis de la proteína NP1.

b) Proteínas sintetizadas en la estirpe supresora

En la figura 19 se muestra el desarrollo de fago que tiene lugar en B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado durante 9 minutos con luz UV como se ha descrito (Métodos 10), después de la infección con el fago normal y con los mutantes sus 15(212) y sus 12 (47). Como puede apreciarse, el desarrollo de fago se produce normalmente en bacterias infectadas por el fago normal y por el mutante sus 15(212) pero no tiene lugar en bacterias infectadas por el mutante sus 12 (47).

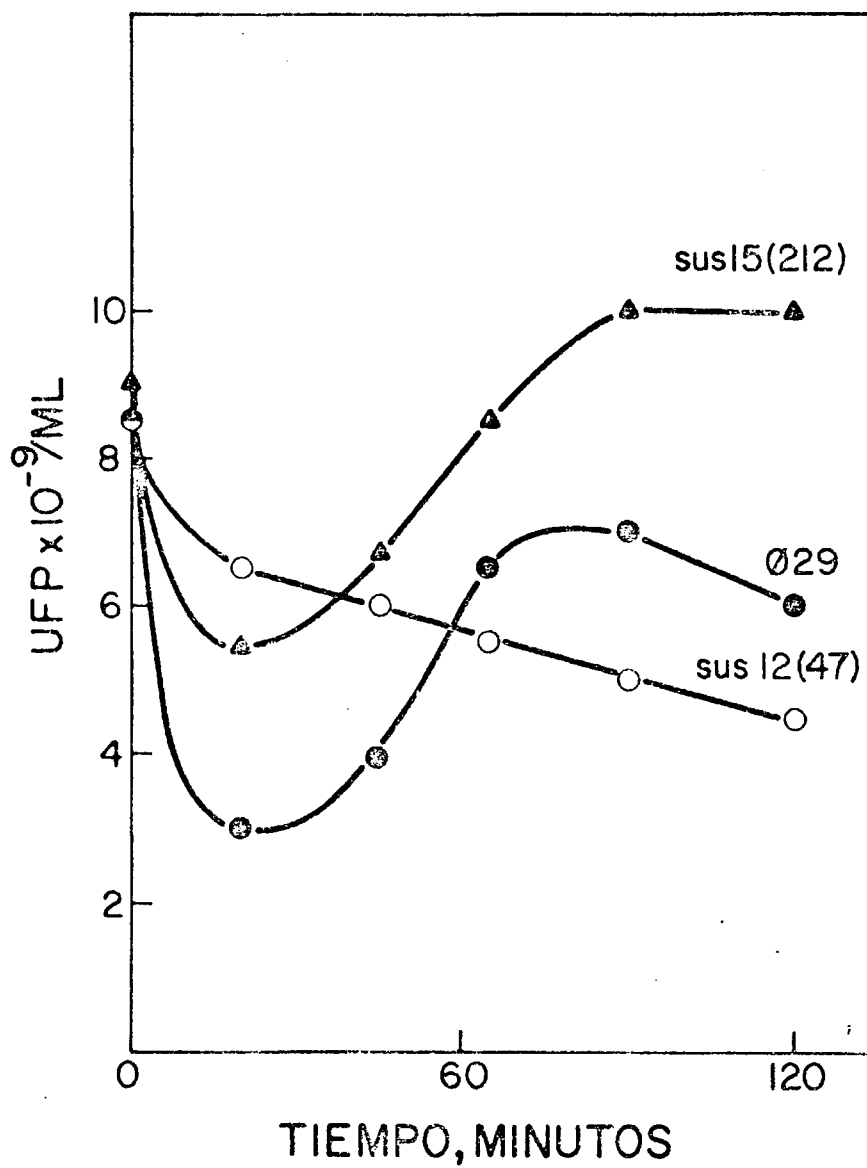


Figura 19. Desarrollo de fago en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 15(212) o sus 12(47)."

La figura 20 muestra el resultado de la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado, después de la infección con el mutante sus 15(212) (marcadas con leu-C¹⁴ de 15 a 60 minutos después de la infección) y con el fago normal (marcadas con leu-H³ en el mismo tiempo). Puede apreciarse en este caso la presencia de proteína p15 en las células infectadas por el mutante. La figura 21, muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la estirpe supresora infectada por el mutante sus 15(212) (marcadas con leu-C¹⁴ de 15 a 60 minutos después de la infección) y en la bacteria sin infectar (marcadas con leu-H³ en el mismo tiempo). En la figura 22, se representa la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada calculada como se ha descrito (97). Una considerable cantidad de proteína p15 está presente en la estirpe supresora infectada por el mutante sus 15(212). De la relación de proteína HP3 (que forma las fibras del fago (26,27)) a proteína p15 en células infectadas por el fago normal y de esta misma relación en células infectadas por el mutante sus 15(212), se puede estimar una eficiencia de supresión de un 64%, un valor alrededor de 8 veces más alto que el obtenido en el caso de B. subtilis MO-99 su⁺³ (47).

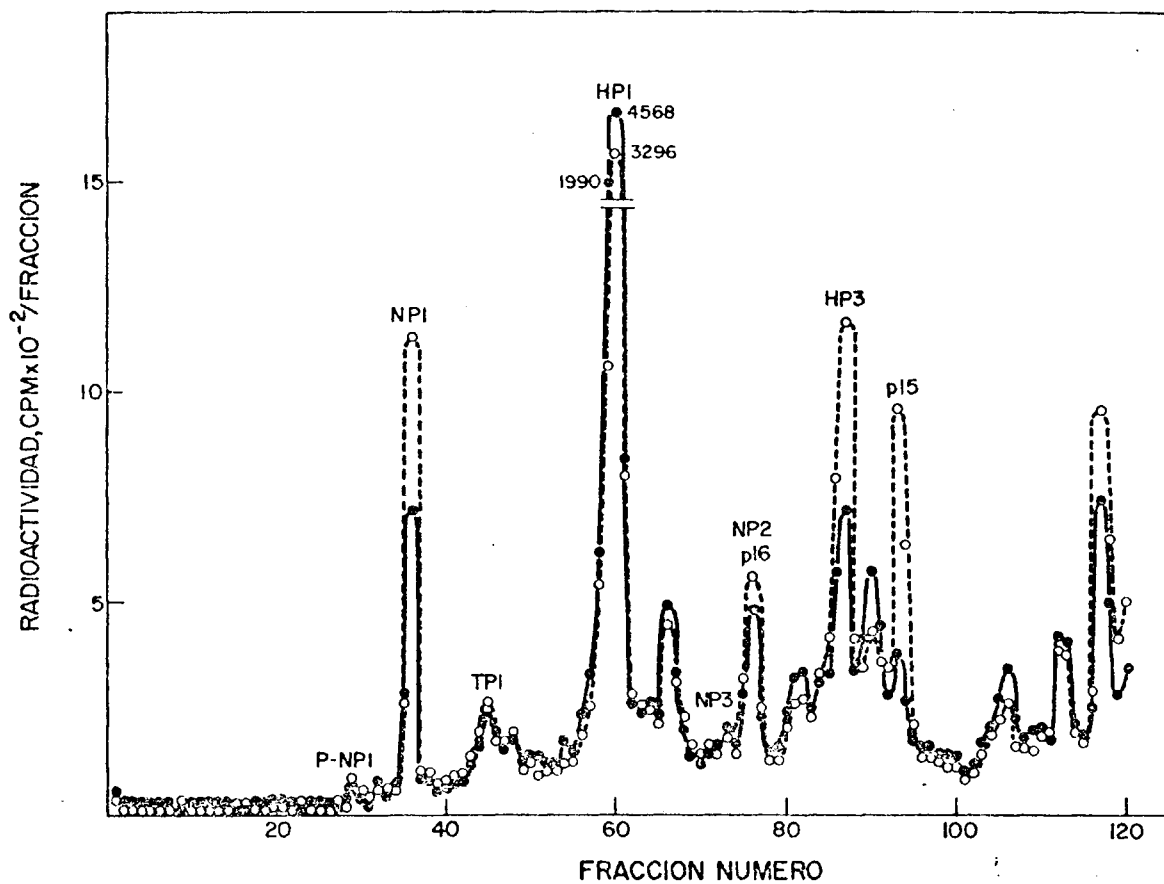


Figura 20. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 15 (212) o con Ø29 normal.

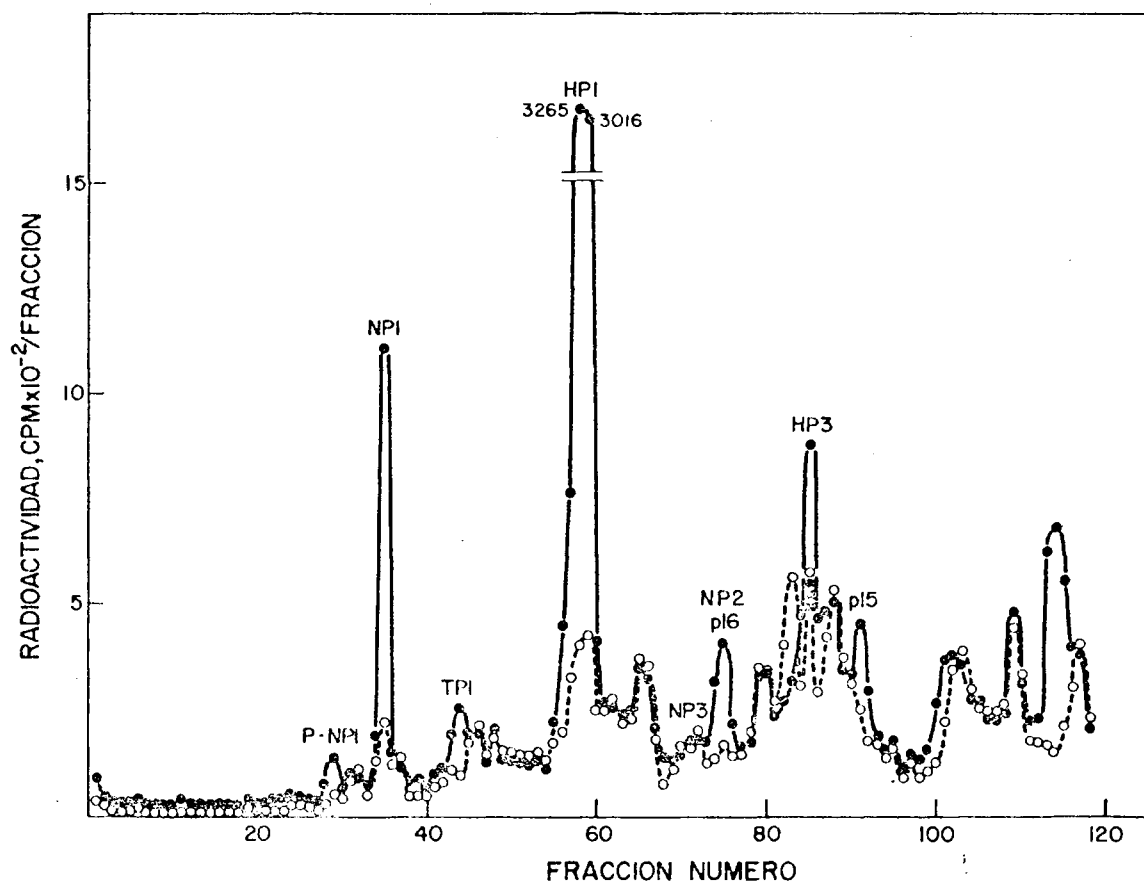


Figura 21. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 15 (212) o sin infectar.

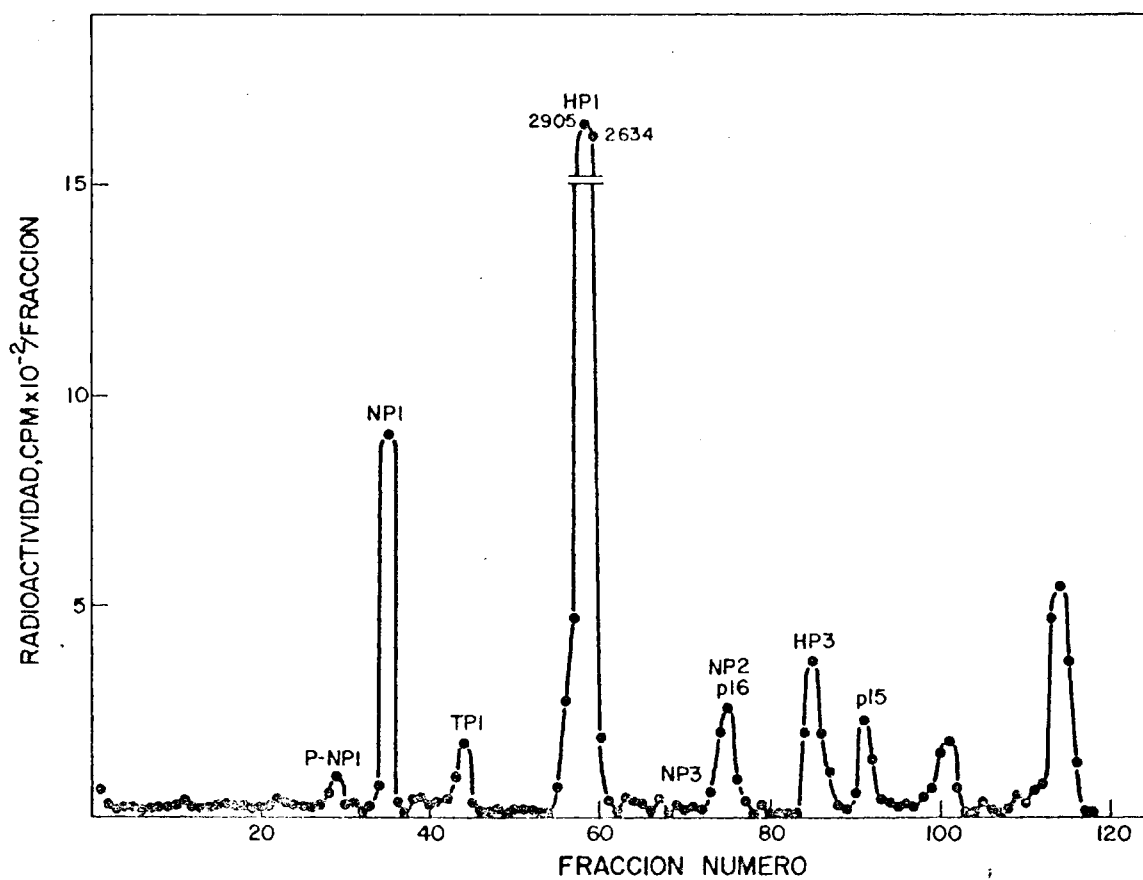


Figura 22. Radioactividad específica del mutante sus 15(212) en B. subtilis su⁺⁴⁴.

Con una eficiencia de supresión tan elevada, se puede decidir si la imposibilidad de desarrollo del mutante sus 12(47) en la estirpe B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ es debida al no reconocimiento por el supresor del triplete sin sentido presente en el mutante o a que el aminoácido insertado por el supresor impida la funcionalidad de la proteína.

La figura 23 muestra la coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe supresora por infección con el fago normal y con el mutante sus 12(47) en la que se ve la no existencia de síntesis de proteína NP1 y la aparición del fragmento de menor peso molecular (NP1*). En la figura 24 se muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en B. subtilis su⁺⁴⁴ después de infección con el mutante sus 12(47) y en la bacteria sin infectar. En la figura 25, se representa la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97), apreciándose claramente la ausencia de la proteína NP1 y la presencia del fragmento de menor peso molecular (NP1*).

Estos resultados indican que la ausencia de desarrollo del mutante sus 12(47) en B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ es debida al hecho de que el supresor

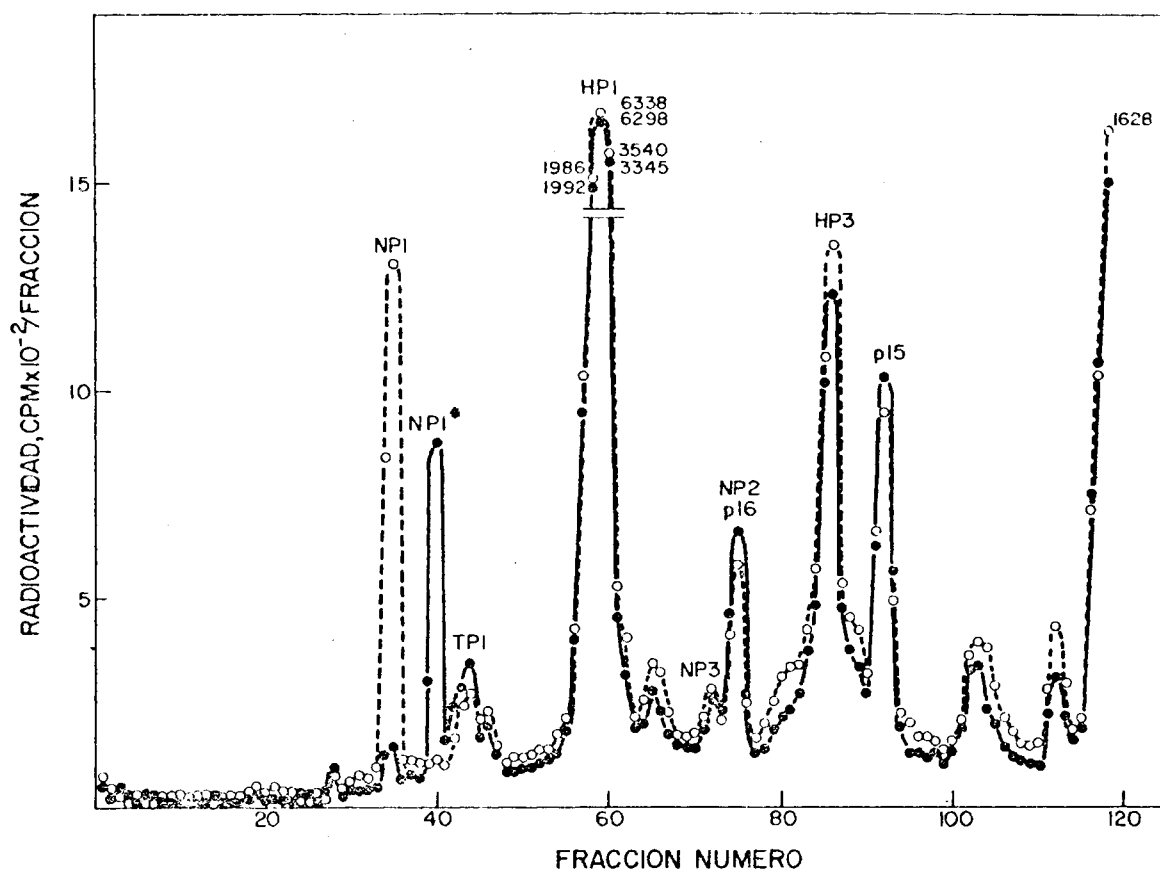


Figura 23. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 12 (47) o con Ø29 normal.

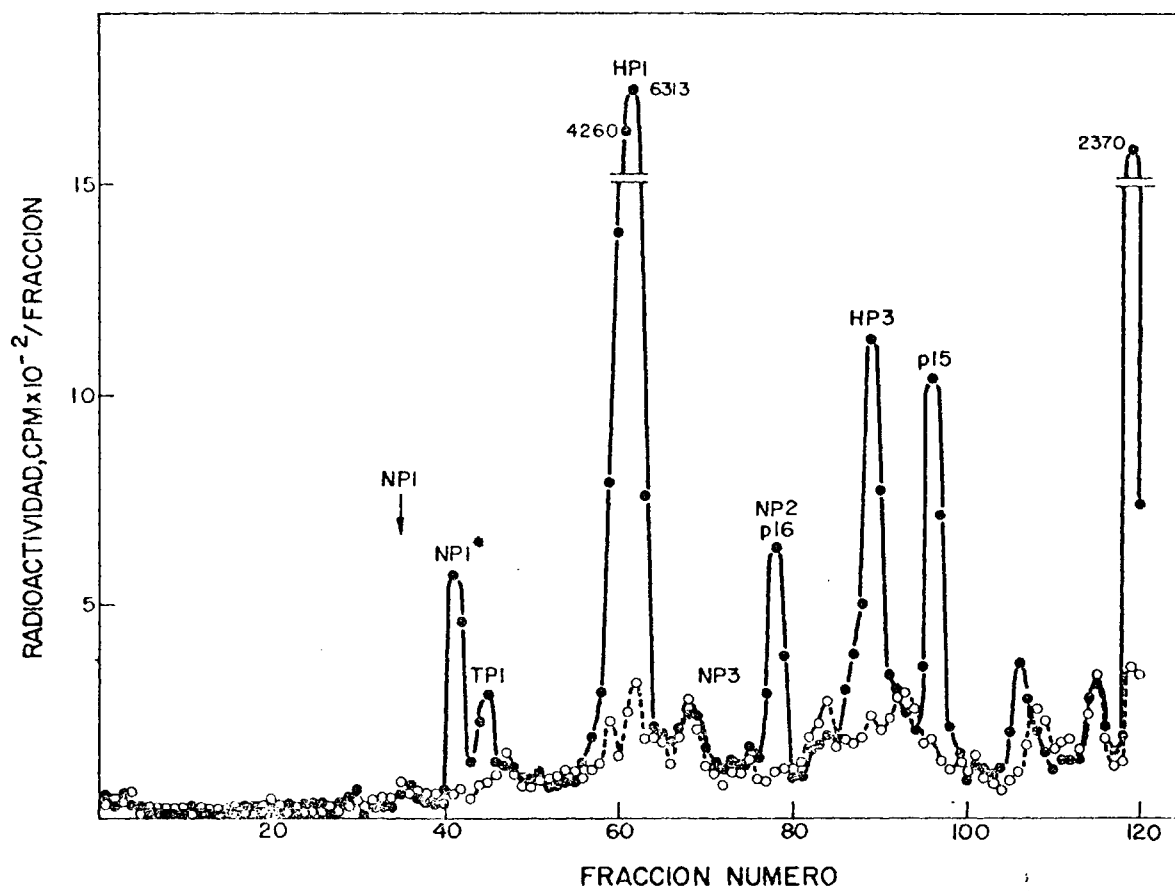


Figura 24. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 12 (47) o sin infectar.

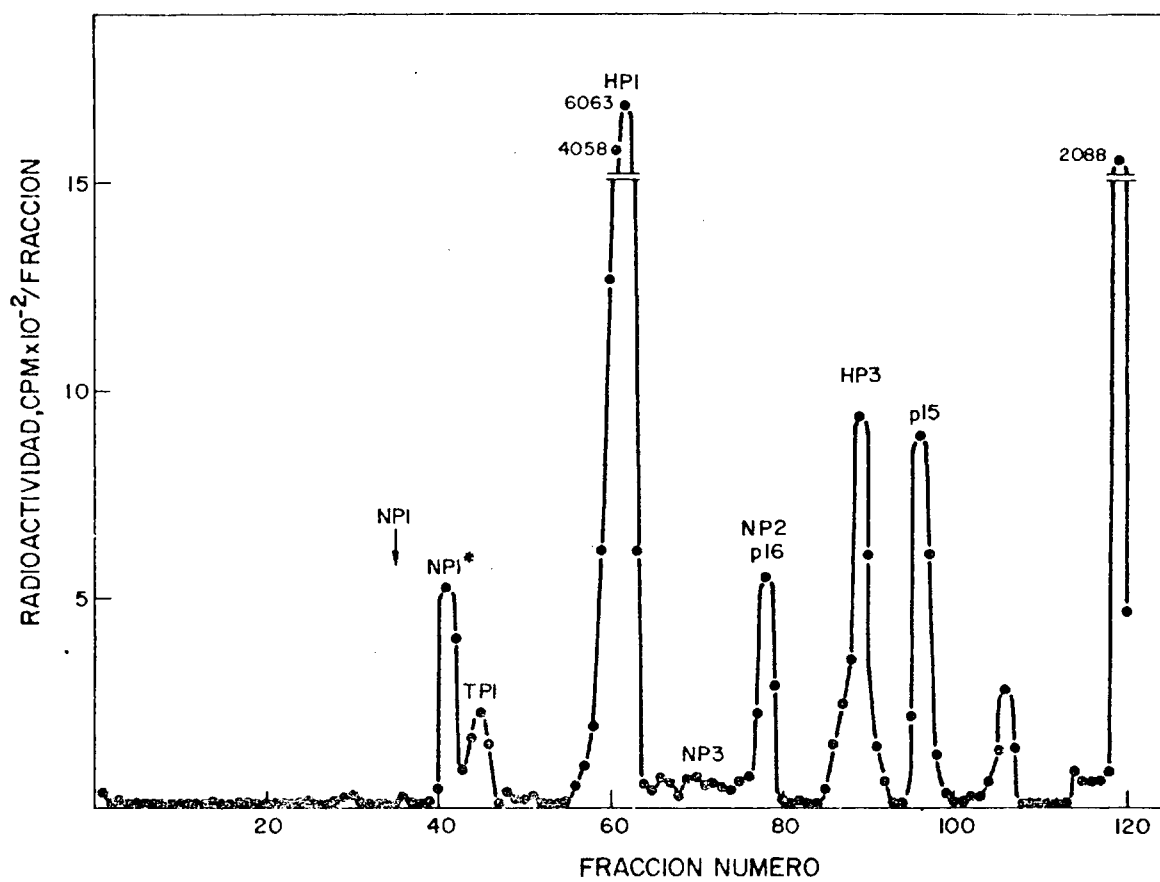


Figura 25. Radioactividad específica del mutante sus 12(47) en B. subtilis su⁺⁴⁴.

es incapaz de reconocer al triplete sin sentido presente en el mutante y no a que el aminoácido insertado por el supresor hiciera no funcional a la proteína.

En la estirpe B. subtilis MO-99 su⁺³ el mutante sus 12(47) puede desarrollarse normalmente, habiéndose estimado la supresión alrededor de un 12% (47).

5) REVERTIENTES DEL MUTANTE SUS 12(47)

Los resultados indicados son consistentes con la posibilidad de que el mutante sus 12(47) contenga una mutación ocre, siendo por tanto B. subtilis MO-101-P su⁺³ un supresor ocre, de acuerdo con su baja eficiencia de supresión (alredor del 10%) (47) y la estirpe B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ un supresor ambar, por lo que no puede suprimir el mutante sus 12(47)(55), a pesar de su elevada eficiencia de supresión (alredor del 60% en el caso del mutante sus 15(212)).

Si el mutante sus 12(47) es ocre, se podían aislar a partir de él, revertientes que fueran ambar, para lo cual basta que ocurra espontáneamente una transición A→G en el triplete sin sentido, de modo que pudieran crecer en ambas estirpes supresoras,

su^{+3} y su^{+44} , puesto que los supresores tipo ocre pueden suprimir los tripletes ambar y ocre (55), de acuerdo con la hipótesis del relajamiento en el apareamiento codon-anticodon, propuesta por Crick (58).

El aislamiento de revertientes del mutante sus 12(47) se realizó mediante el procedimiento siguiente: el mutante sus 12(47) se plaqueó sobre la estirpe B. subtilis MO-101-P su^{+44} a una dilución apropiada de acuerdo con la frecuencia de reversión del mutante sus y de manera que se obtuvieran 100 placas de lisis por placa Petri. Quinientas placas de lisis independientes, obtenidas de esta manera, se replicaron con palillos estériles sobre placas Petri previamente sembradas con B. subtilis 110NA su^{-} y con B. subtilis M)-101-P su^{+44} y en este orden. Los revertientes que podían desarrollarse en la estirpe supresora su^{+44} y no en la su^{-} , fueron seleccionados y comprobados nuevamente por plaqueo en la estirpe supresora su^{+44} y sometidos a un nuevo ciclo de replicación. Aquellos revertientes para los que confirmó su capacidad de desarrollo en la estirpe su^{+44} se seleccionaron y se comprobó nuevamente por plaqueo que eran capaces de crecer en ambas estirpes supresoras, B. subtilis su^{+3} y su^{+44} .

De los 500 revertientes del mutante sus 12 (47) que podían crecer en B. subtilis su^{+44} , 26 de ellos fueron revertientes sus, no pudiendo crecer en B. subtilis 110NA su^{-} y sí en B. subtilis su^{+3} y B. subtilis su^{+44} .

Mediante experimentos de complementación cualitativa (Métodos 17aII) estos 26 revertientes se localizaron en el cistrón 12. Uno de ellos, el mutante sus 12(610), se escogió para su estudio posterior. La recombinación del mutante sus 12(610) con el mutante sus 12(47) se llevó a cabo en la estirpe supresora su^{+3} (Métodos 18a), llevando como controles infecciones simples con cada uno de los mutantes. El índice de recombinación entre ambos mutantes es de 0,01, calculado como se ha descrito (Métodos 18a), siendo 0,01 y 0,003 los porcentajes de fago capaz de crecer en la estirpe B. subtilis 110NA su^{-} perteneciente a la progenie de las infecciones simples de B. subtilis su^{+3} con los mutantes sus 12(47) y sus 12(610), respectivamente, llevadas como control. Estos porcentajes reflejan la cantidad de fago revertiente al tipo normal que se produce en la infección por cada mutante en la estirpe supresora y se calculan dividiendo el número de placas presentes en condiciones restrictivas por el número de

placas presentes en condiciones permisivas y multiplicando por 100 el cociente.

La diferencia entre el índice de recombinación entre ambos mutantes y la suma de los porcentajes de fago revertiente al tipo normal producido en la infección individual de cada mutante, resulta ser nula, lo que sugiere que ambos mutantes, sus 12(610) y sus 12(47), tienen la misma localización en el mapa genético.

6) PROTEINAS INDUCIDAS POR INFECCION DE B. SUBTILIS MO-101-P SU⁻ Y SU⁺⁴⁴ Y B. SUBTILIS MO- 99-P SU⁺³ CON EL MUTANTE SUS 12(610)

Si el mutante sus 12(610), aislado como revertiente del mutante sus 12(47), capaz de crecer en B. subtilis su⁺⁴⁴ y en B. subtilis su⁺³, se hubiera producido al tener lugar espontaneamente una transición A→G a nivel de tercera base del triplete sin sentido contenido en el mutante sus 12(47), la proteína NP1, producto del cistrón 12, debe ser sintetizada en las estirpes supresoras su⁺³ y su⁺⁴⁴ después de ser infectadas con el mutante sus 12(610) y el nivel en que esta síntesis ocurra, será el determinado por la eficiencia de supresión debida a cada estirpe supresora.

Con objeto de comprobar esta hipótesis, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Métodos 11a) las preteínas sintetizadas en las estirpes B. subtilis MO-101-P su^- y su^{+44} y en la estirpe B. subtilis MO-99 su^{+3} irradiadas con luz UV e infectadas con el mutante sus 12(610) y con el fago normal.

a) Proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora

En la figura 26 se muestra el desarrollo de fago que tiene lugar después de la infección de B. subtilis MO-101-P su^- irradiada 10,5 minutos, como se ha descrito (Métodos 10) con el fago normal y con el mutante sus 12(610). Como puede apreciarse, el mutante es incapaz de desarrollarse en la estirpe no supresora.

Para estudiar la síntesis de las proteínas inducidas por el mutante sus 12(610) en la infección de la estirpe no supresora, las coelectroforesis del cultivo infectado por el mutante (marcado con leu- C^{14} del minuto 15 al 60 después de la infección) y de los cultivos infectados por el fago normal o sin infectar (marcados con leu- H^3 al mismo tiempo después de infección) se llevaron a cabo como se ha descrito (Métodos 11a).

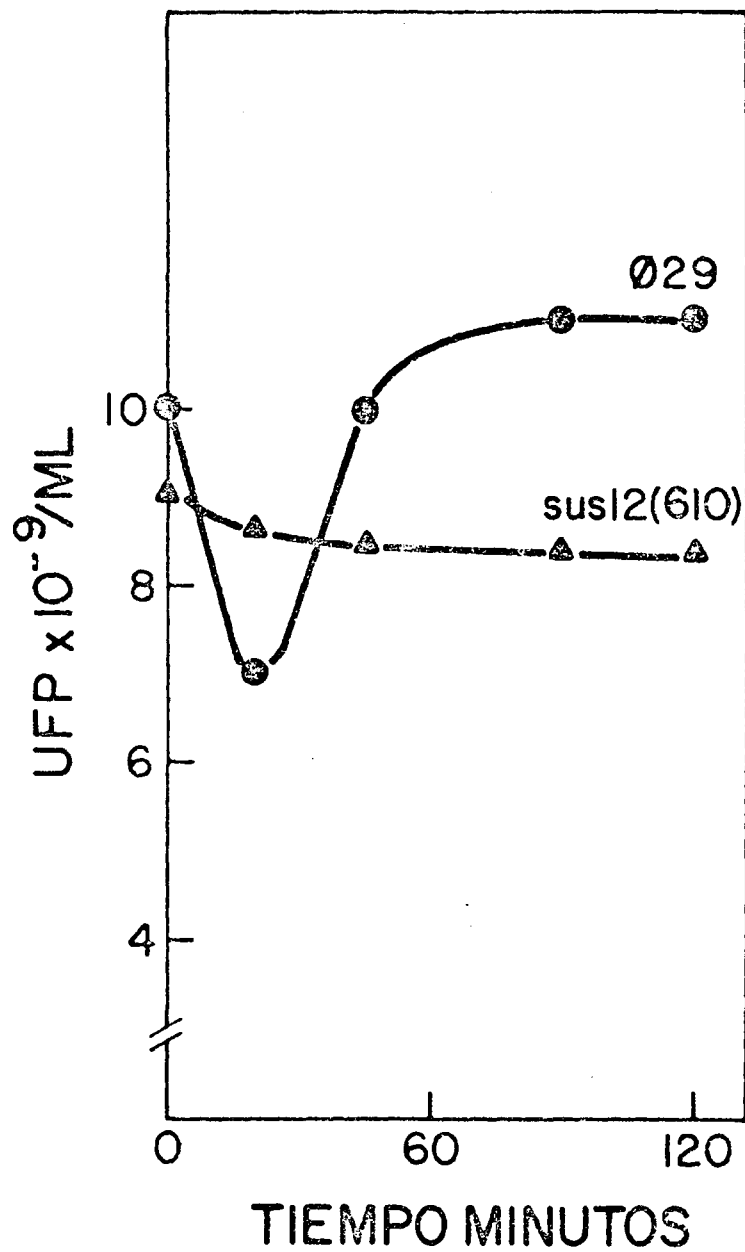


Figura 26. Desarrollo de fago en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con Ø29 normal o con el mutante sus 12(610).

La figura 27 muestra el resultado de la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora después de la infección con el mutante sus 12(610) y con el fago normal, puede observarse la ausencia de síntesis de la proteína NP1 así como la aparición del fragmento de menor peso molecular (NP1*) análogamente a lo observado anteriormente con el mutante sus 12(47) (Resultados 4a) y de acuerdo con los resultados anteriores (47).

La figura 28 muestra la coelectroforesis de los polipéptidos sintetizados en la estirpe B. subtilis MO-101-P su⁻ infectada con el mutante sus 12(610) y en la bacteria sin infectar. En la figura 29 se representa la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97). La ausencia de proteína NP1, queda claramente determinada en todos los casos.

b) Proteínas sintetizadas en las estirpes supresoras

Las estirpes B. subtilis su⁺⁴⁴ y su⁺³ fueron irradiadas con luz UV durante 10,5 y 9 minutos,

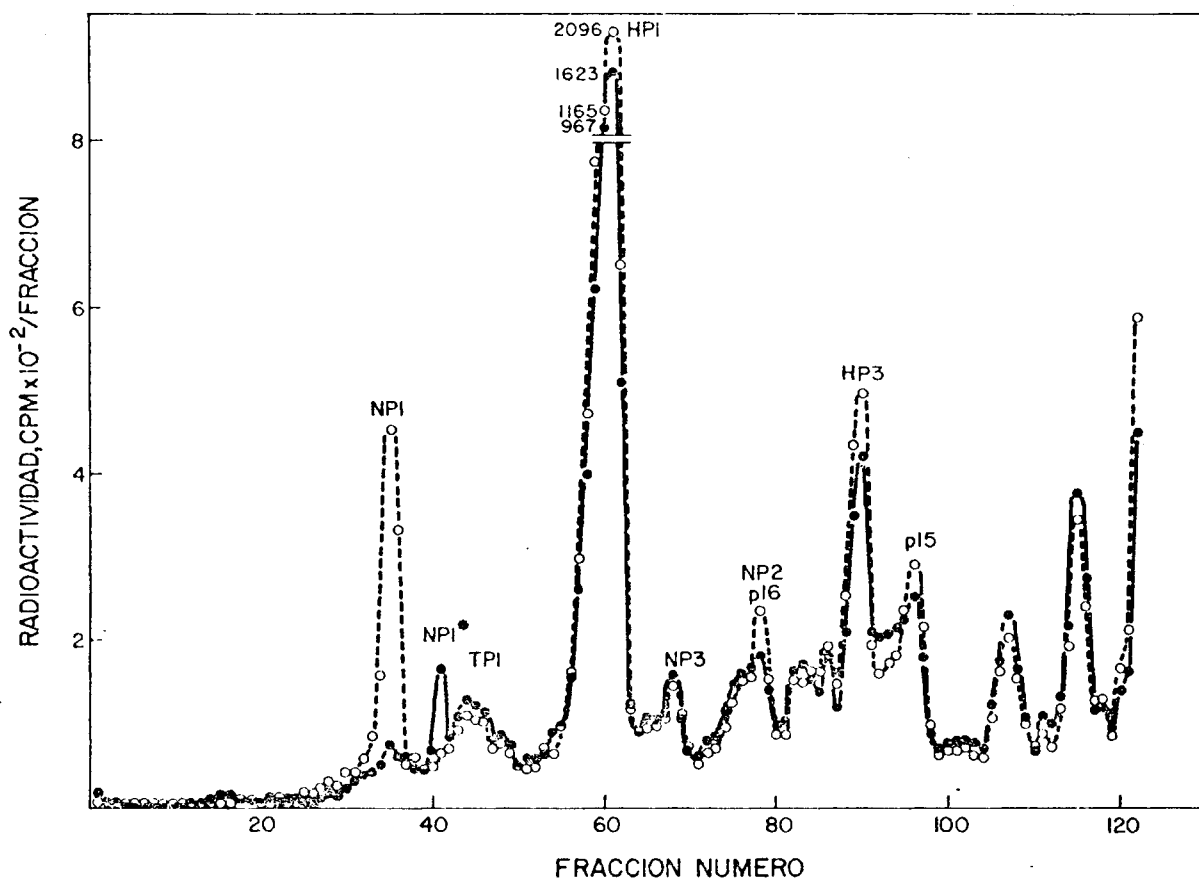


Figura 27. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o con ø29 normal.

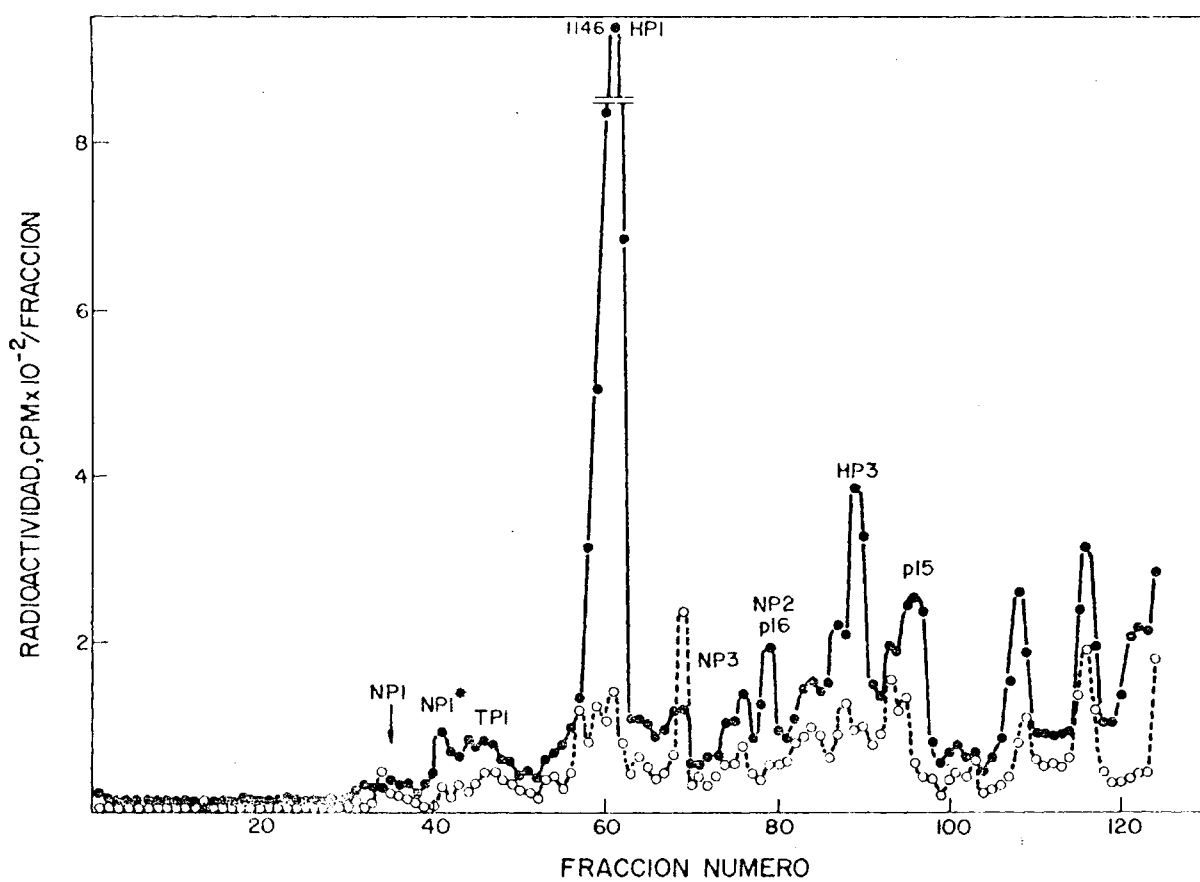


Figura 28. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o sin infectar.

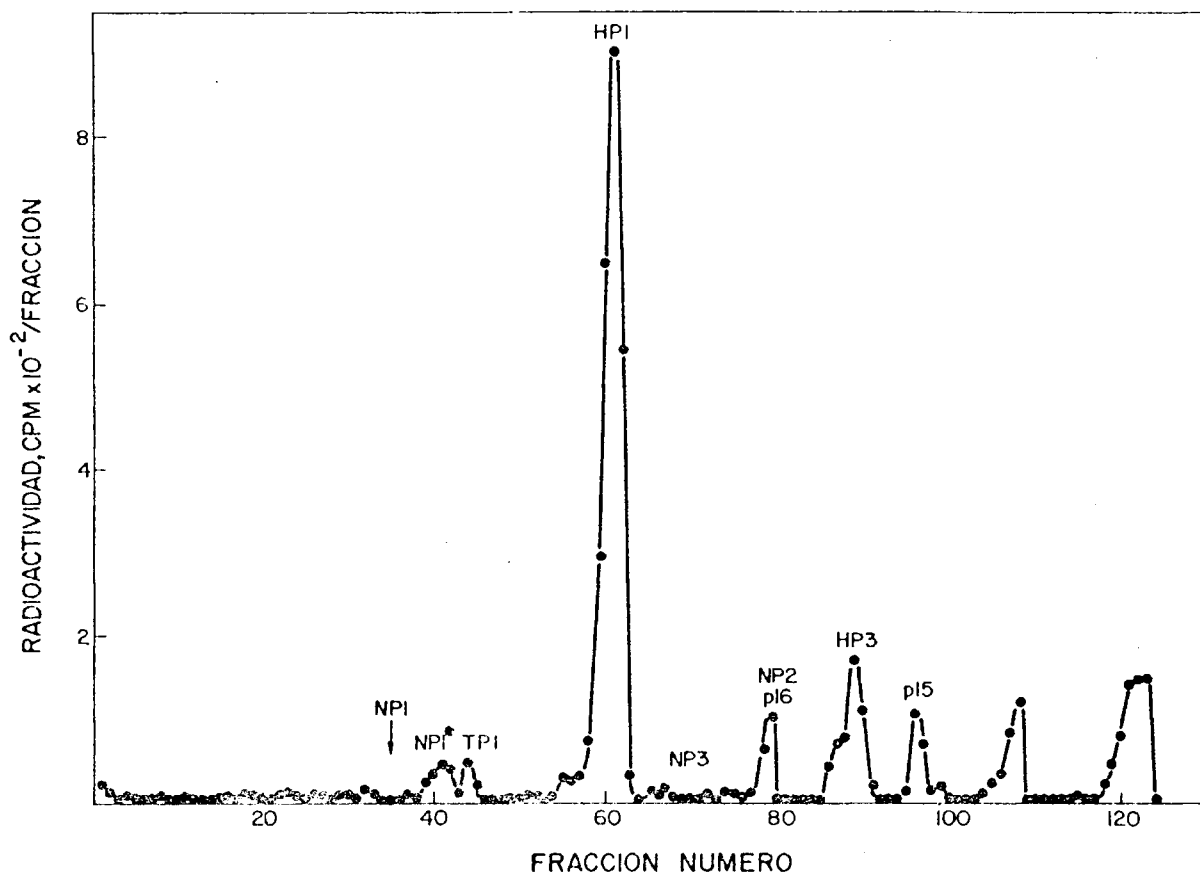


Figura 29. Radioactividad específica del mutante sus 12(610) en B. subtilis su⁻.

respectivamente, infectadas con el mutante sus 12 (610) y marcadas de 15 a 60 minutos con leu-C¹⁴ en el caso de su⁺⁴⁴ y de 15 a 25 minutos en el caso de su⁺³, o infectadas con el fago normal y marcadas con leu-H³ durante el mismo tiempo indicado en cada caso. Las células sin infectar se marcaron con leu-H³ a los mismos tiempos según la bacteria usada.

La figura 30 muestra el desarrollo de fago que tiene lugar después de la infección de B. subtilis su⁺⁴⁴ con el fago normal y con el mutante sus 12(610). La figura 31 refleja lo mismo, pero en el caso de B. subtilis su⁺³. En ambos casos puede observarse como el mutante es perfectamente capaz de desarrollarse en ambas estirpes supresoras.

La figura 32 muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en B. subtilis su⁺³ después de la infección con el mutante sus 12(610) y con el fago normal. Puede observarse la aparición de una pequeña cantidad de proteína NP1 así como la existencia del fragmento de menor peso molecular (NP1*), de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente (47).

La figura 33 presenta los resultados de la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la estirpe su⁺³ en la infección con el mutante sus 12(610)

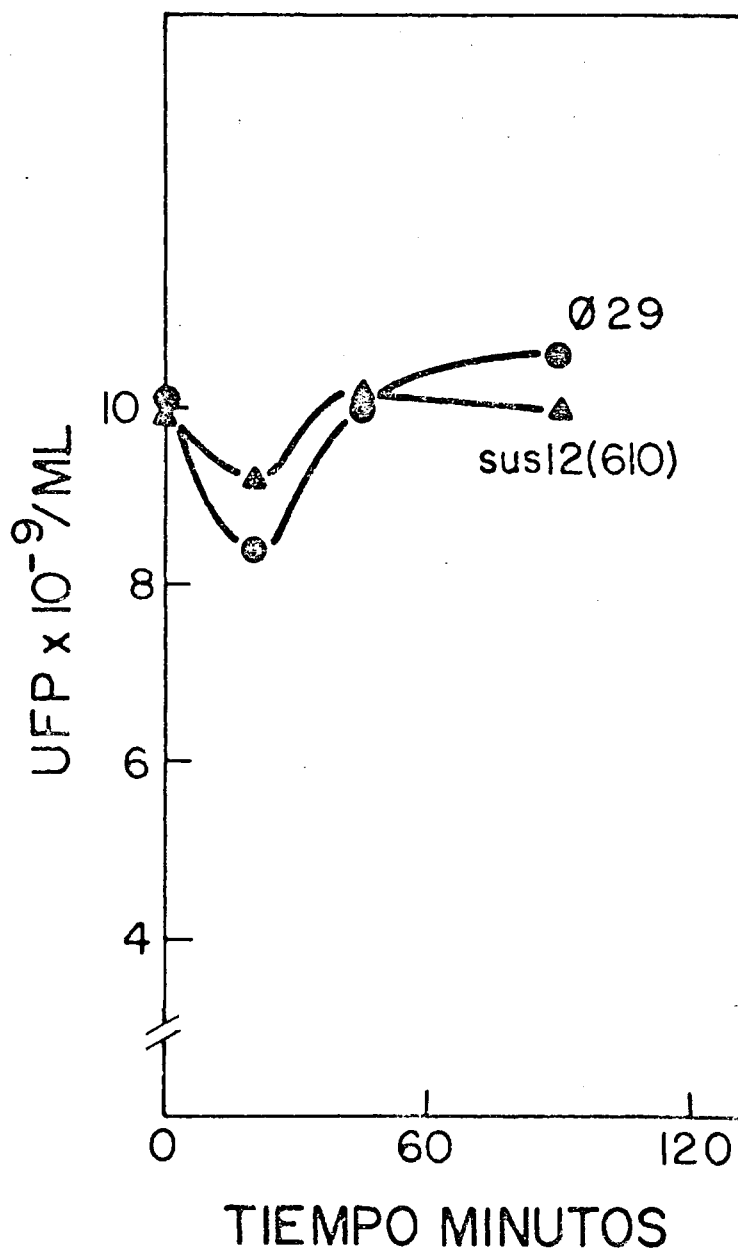


Figura 30. Desarrollo de fago en B. subtilis su^{+44} irradiado e infectado con Ø29 normal o con el mutante sus 12(610).

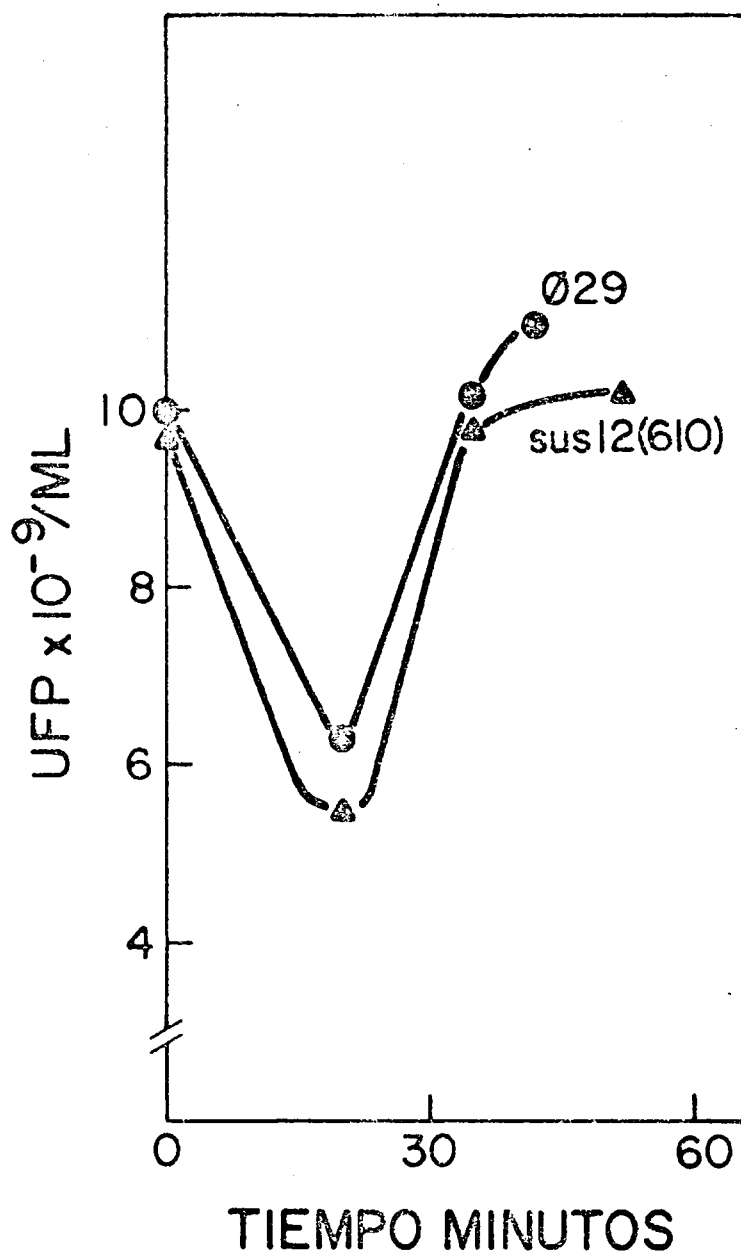


Figura 31. Desarrollo de fago en *B. subtilis* su⁺³ irradiado e infectado con Ø29 normal o con el mutante sus 12(610).

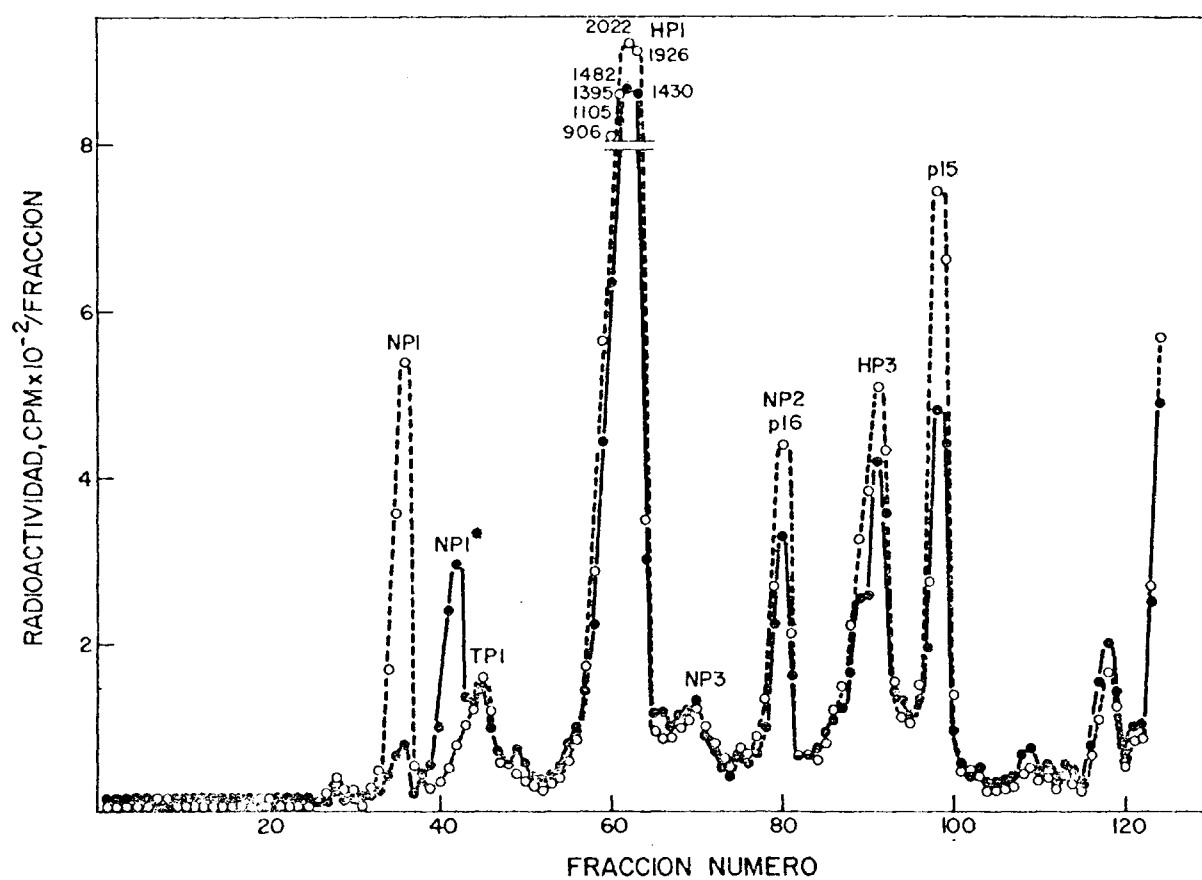


Figura 32. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺ irradiado e infectado con el mutante sus 12 (610) o con Ø29. -

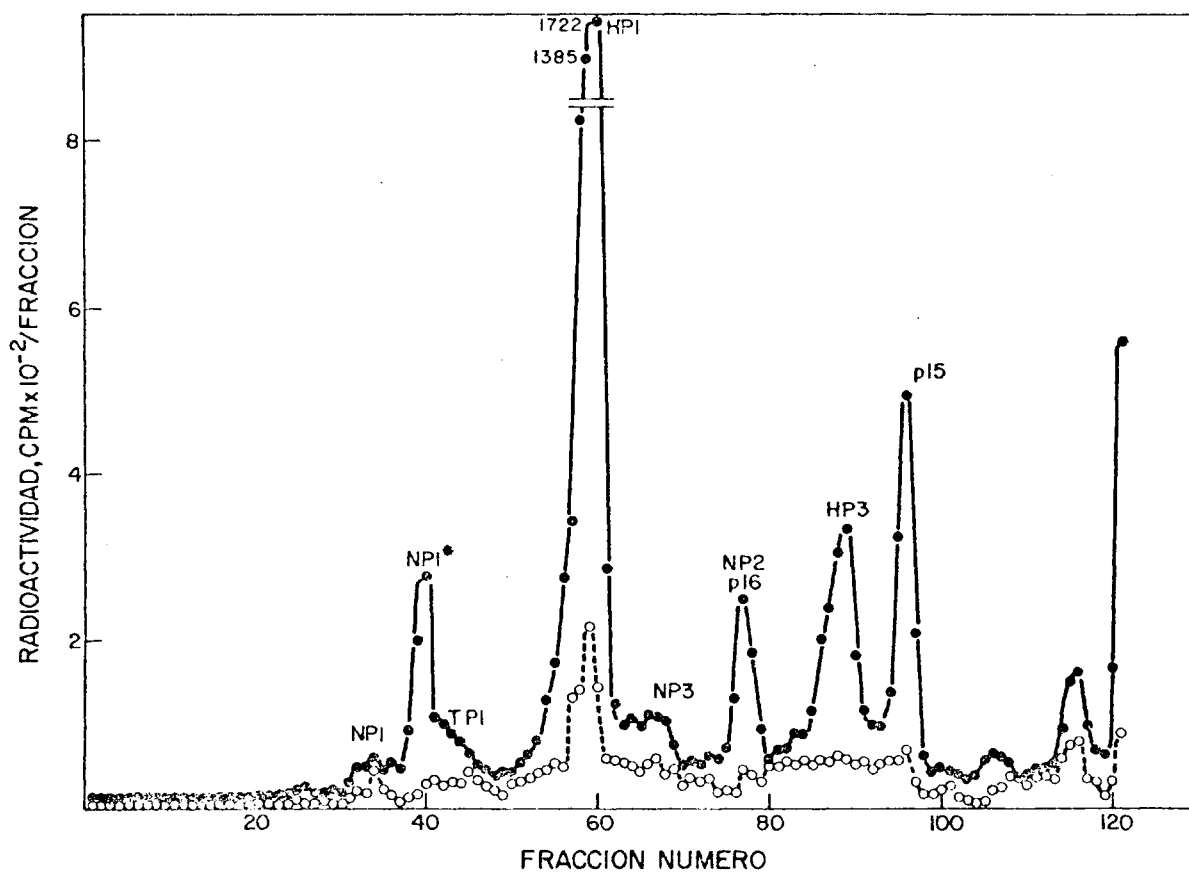


Figura 33. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺ irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o sin infectar.

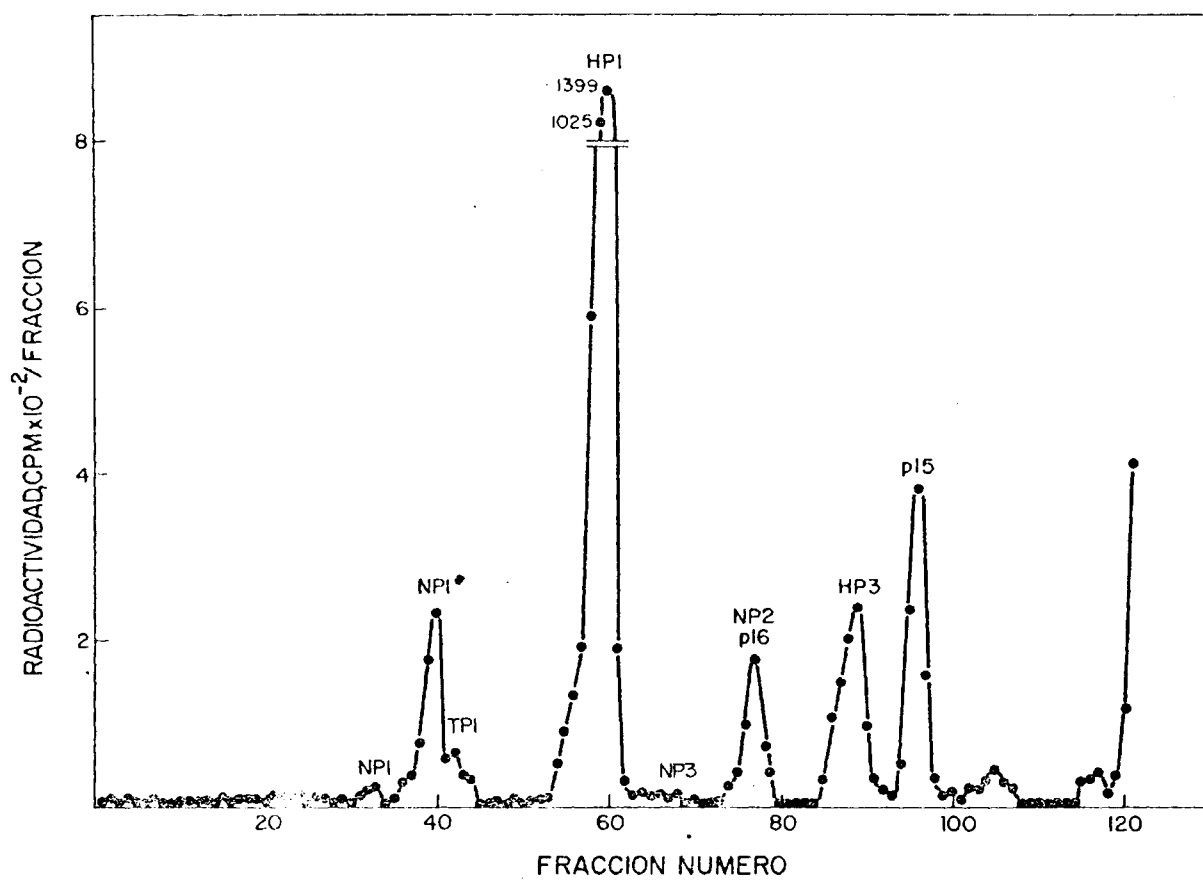


Figura 34. Radioactividad específica del mutante sus 12(610) en B. subtilis su⁺³.

y en la bacteria sin infectar. En la figura 34, se presenta la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97).

De la relación de radioactividad presente en la proteína NP1 a la radioactividad presente en la proteína NP1 y el fragmento NP1*, se puede estimar una eficiencia de supresión de un 8%, valor que es similar al del 12% obtenido para la supresión del mutante sus 12(47) (47).

La figura 35 presenta el resultado de la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la infección de B. subtilis su⁺⁴⁴ por el mutante sus 12(610) y por el fago normal. Puede apreciarse la presencia de una cantidad considerable de proteína NP1, y la existencia del fragmento NP1*, si bien éste está presente en menor cantidad que en el caso de B. subtilis su⁺³.

La figura 36 muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la estirpe su⁺⁴⁴ infectada con el mutante sus 12(610) y en la bacteria sin infectar. La figura 37 representa la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97). De la relación del

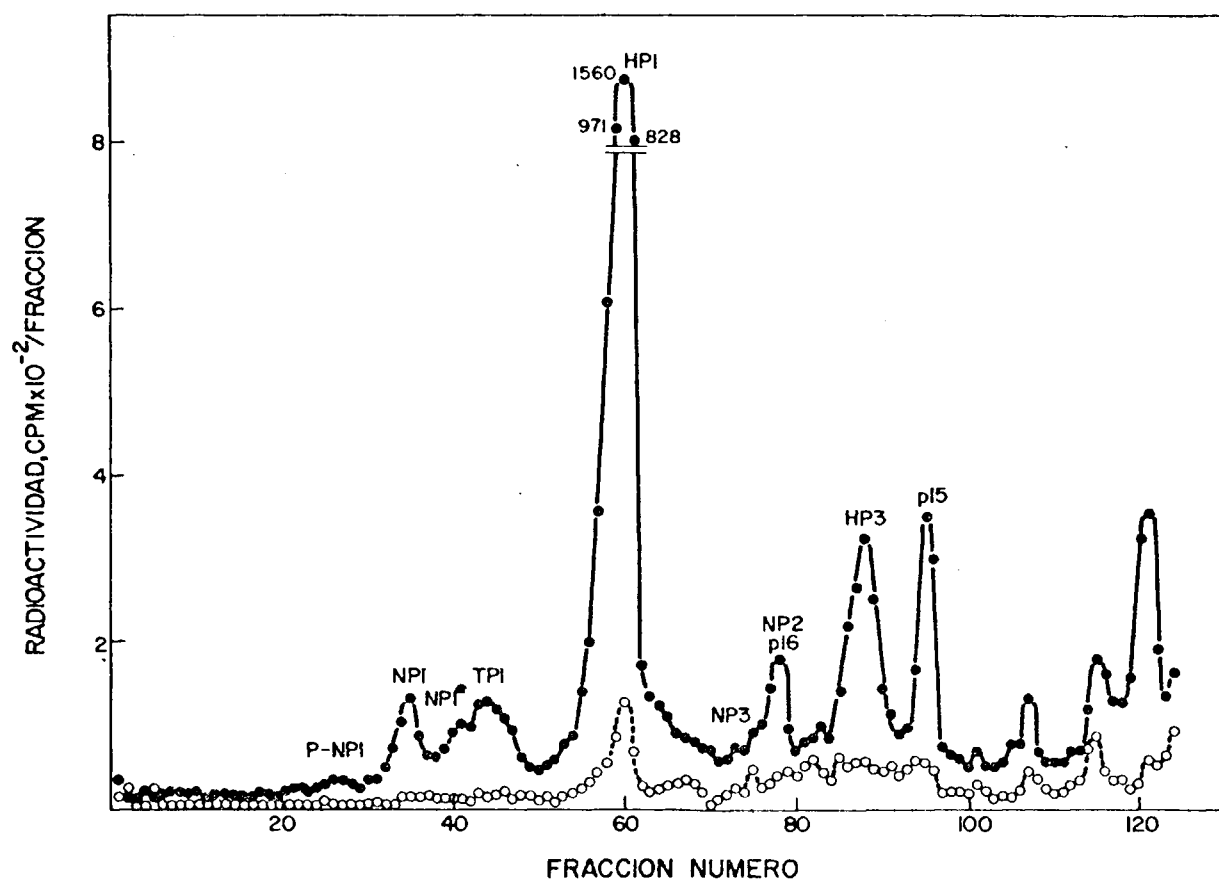


Figura 36. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o sin infectar.

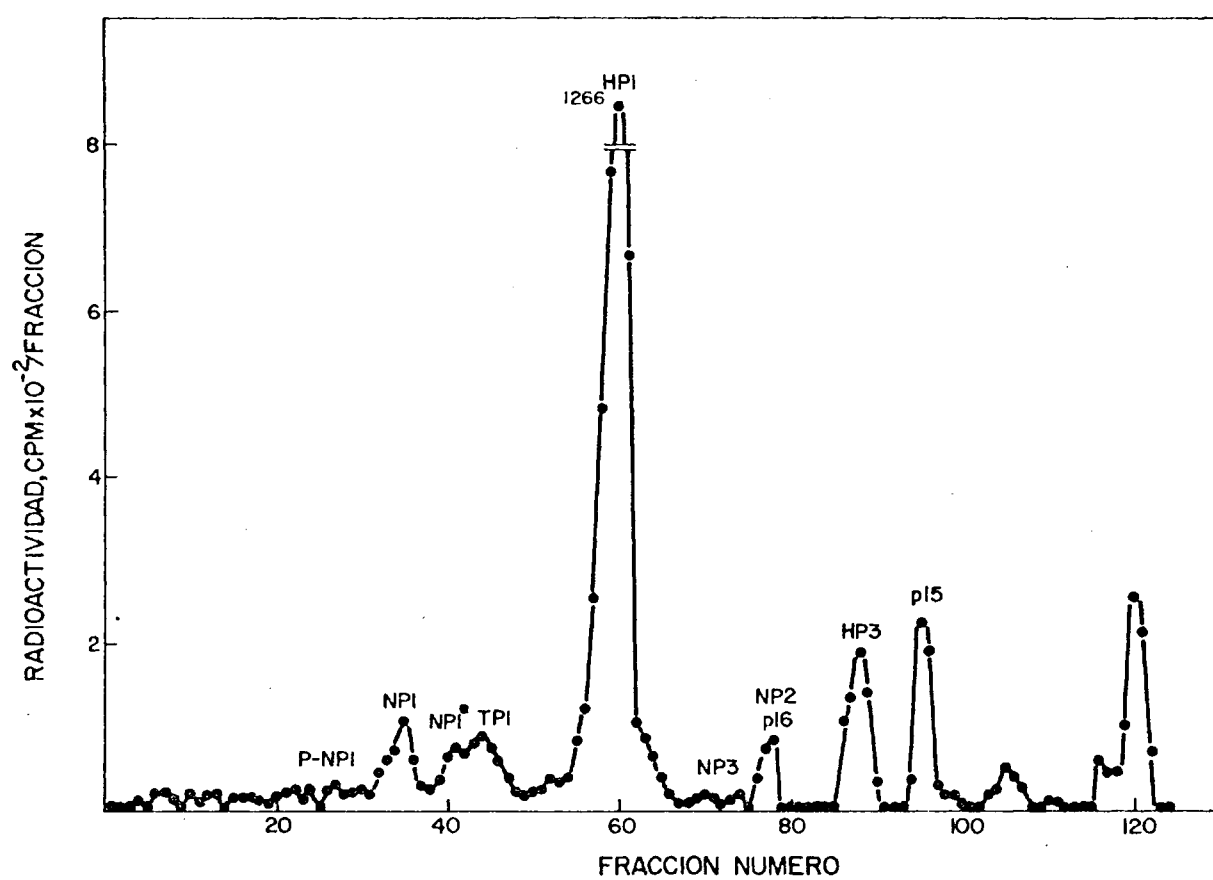


Figura 37. Radioactividad específica del mutante sus 12(610) en B. subtilis su⁺⁴⁴.

número de cuentas por minuto contenidas en el pico de proteína NP1, respecto del número de cuentas por minuto, suma de las contenidas en el mismo pico y en el pico del fragmento NP1*, se puede estimar una eficiencia de supresión del 57%, valor que es 7 veces más alto que el obtenido en el caso de la estirpe B. subtilis su⁺³, y que concuerda bastante bien con el valor del 64% obtenido en la supresión del mutante sus 15(212) (Resultados 4b).

Los resultados anteriormente expuestos, sugieren que la estirpe B. subtilis su⁺³ contiene un supresor ocre y que la estirpe B. subtilis su⁺⁴⁴ contiene un supresor ambar. El mutante sus 12(47) podría contener una mutación ocre que puede ser suprimida por el supresor su⁺³ pero no por el supresor su⁺⁴⁴. En el caso del revertiente sus 12(610), se puede haber producido una transición A→G en la tercera base del triplete dando lugar a una mutación ambar que puede ser suprimida por ambas estirpes supresoras, su⁺³ (ocre) y su⁺⁴⁴ (ambar).

7) MUTANTES SUS DE Ø29 OBTENIDOS POR MUTAGENESIS CON
NITROSOGUANIDINA

Las colecciones de mutantes sus de Ø29 (49,50) han sido obtenidas utilizando estirpes supresoras que contenían el supresor su^{+3} aislado por Georgopoulos (45) cuya eficiencia de supresión es débil (47 y Resultados 6b).

La obtención de una nueva colección de mutantes sus de Ø29 utilizando la estirpe supresora B. subtilis MO-101-P su^{+44} cuya elevada eficiencia de supresión ha sido determinada (Resultados 6b), se abordó con dos objetivos concretos: primero, comprobar si utilizando este supresor se podían obtener mutantes en cistrones aún no identificados, o en cistrones que codificasen proteínas cuya síntesis se requiera en cantidad alta para el desarrollo del fago; estos mutantes podrían no haberse obtenido utilizando la estirpe portadora del supresor su^{+3} , debido a que su baja eficiencia de supresión no permitiría la síntesis de la proteína o proteínas en cuestión en cantidad suficiente para el desarrollo del mutante o mutantes que serían inviables en esta estirpe supresora. Segundo, comprobar que los mutantes sus obtenidos empleando para su selección la

estirpe B. subtilis su^{+44} , que de acuerdo con los resultados obtenidos, contiene un supresor ambar, eran capaces de desarrollarse en la estirpe B. subtilis MO-99 su^{+33} , que de acuerdo con esos resultados contiene un supresor ocre, puesto que los supresores ocre son capaces de suprimir mutaciones ambar y ocre (55,61).

Por mutagénesis con nitrosoguanidina (Métodos 15) y utilizando B. subtilis MO-101-P su^{+44} como estirpe supresora, se ha aislado una colección de 59 mutantes sus de $\phi 29$, seleccionados por su capacidad para crecer en la estirpe supresora y no en B. subtilis 110NA su^{-} como se ha descrito (Métodos 16).

Los mutantes sus de $\phi 29$ de esta colección, se agruparon en los diferentes cistrones por experimentos de complementación cualitativa (Métodos 17 aII), utilizando los mutantes representantes de grupo de las colecciones de Moreno y col. (49) y de Reilly y col. (50).

En la tabla XIII, se muestran los resultados de la complementación cuantitativa realizada como se ha descrito (Métodos 17b), entre los mutantes sus representantes de grupo de las colecciones existentes (49,50), y los mutantes sus representantes de grupo de la colección aislada utilizando B. subtilis su^{+44} como estirpe supresora.

Tabla XIII. Complementación cuantitativa de los
mutantes sus de Ø29 representantes de
grupo aislados con nitrosoguanidina y
de las diferentes colecciones.

<u>Cistron</u>	<u>Mutantes sus</u>	<u>Porcentaje de Complementacion</u>
2	2(513) x NG2020 (0,04) (0,11)	0,11
3	3(91) x NG231 (0,004) (0,07)	0,03
4	4(56) x NG162 (0,007) (0,01)	0,01
6	6(626) x NG252 (0,5) (0,5)	0,8
7	7(614) x NG81 (0,01) (0,007)	0,007
8	8(769) x NG2050 (0,01) (0,01)	0,01
9	9(422) x NG235 (0,006) (0,11)	0,02
10	10(136) x NG192 (0,004) (0,001)	0,006
11	11(542) x NG57 (0,001) (0,02)	0,02
12	12(305) x NG204 (0,1) (0,004)	0,02
13	13(55) x NG72 (0,15) (0,005)	0,07
15	15(212) x NG194 (0,1) (0,08)	0,24
16	16(241) x NG84 (0,01) (0,03)	0,06

Los números entre paréntesis corresponden a los índices
de complementación individuales. La complementación se
realizó como se describe en Métodos 17b.

En la table XIV, se presenta la distribución en cistrones de la colección de mutantes sus de Moreno y col. (49) obtenida utilizando B. subtilis su⁺³ como estirpe supresora, en comparación con la distribución en cistrones de los 59 mutantes aislados utilizando B. subtilis su⁺⁴⁴ como estirpe supresora. Como puede apreciarse, se consiguieron representantes en 3 cistrones que no se habían obtenido en la colección aislada utilizando el supresor su⁺³ (49). No obstante, no han sido obtenidas mutaciones en cistrones diferentes de los anteriormente identificados (49, 50).

La tabla XV muestra la supresión por B. subtilis MO-99 su⁺³ de los mutantes sus obtenidos utilizando B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ como estirpe supresora. De los 59 mutantes agrupados en 13 cistrones, 14 de ellos, repartidos en 6 cistrones diferentes, no pueden desarrollarse en la estirpe su⁺³, contrariamente a lo que cabría esperar si B. subtilis su⁺³ fuera un supresor ocre (55). Este resultado no sería tan sorprendente si el aminoácido insertado por la estirpe su⁺³ hiciera a la proteína no funcional, o si la proteína suprimida, no lo fuera en cantidad suficiente para permitir el desarrollo del mutante. Esta última posibilidad parece improbable, dado que en todos los cistrones hay

Tabla XIV. Grupos de complementación de mutantes *su*⁺ de Ø29 aislados en *B. subtilis* *su*⁺³ y *su*⁺⁴⁴.

<u>Cistron</u>	<u><i>su</i>⁺³</u>	<u><i>su</i>⁺⁴⁴</u>
1	—	—
2	3	3
3	6	5
4	10	2
5	—	—
6	—	2
7	—	1
8	—	6
9	1	3
10	10	5
11	4	3
12	1	2
13	59	13
14	1	—
15	4	8
16	2	6
17	1	—
Total cistrones afectados	13	13

Tabla XV. Supresión por B. subtilis su⁺³ de mutantes sus de Ø29 aislados en B. subtilis su⁺⁴⁴.

<u>Cistron</u>	<u>su⁺³^a</u>	
	<u>Suprimido</u>	<u>No Suprimido</u>
2	3	0
3	3	2
4	2	0
6	2	0
7	1	0
8	4	2
9	1	2
10	3	2
11	3	0
12	2	0
13	10	3
15	8	0
16	3	3

^a Valores referidos al número de mutantes aislados en B. subtilis su⁺⁴⁴ que son suprimidos y no suprimidos, respectivamente, en B. subtilis su⁺³.

al menos, un mutante que sí es suprimido por B. subtilis su^{+3} . De cualquier modo y, en ambos casos, se podría obtener supresión a nivel de proteína.

- 8) PROTEINAS INDUCIDAS POR INFECCION DE B. SUBTILIS MO-101-P SU^{-} Y SU^{+44} Y MO-99 SU^{+3} CON LOS MUTANTES SUS 8(769) Y SUS 8(22).

Para comprobar si la estirpe su^{+3} era capaz de suprimir a nivel de proteína a mutantes sus obtenidos sobre la estirpe supresora su^{+44} , que eran incapaces de desarrollarse sobre la estirpe su^{+3} , se escogió el mutante sus 8(22) que cumplía esta condición para estudiar las proteínas inducidas por este mutante en la infección de ambas estirpes supresoras. El mutante sus 8(769) pertenece a la colección de Reilly y col. (50) y es capaz de desarrollarse en ambos supresores, su^{+3} y su^{+44} , lo que convierte en un control positivo idóneo. El control negativo vendrá dado por las proteínas inducidas por infección de B. subtilis MO-101-P su^{-} , con cada uno de estos dos mutantes.

- a) Proteínas sintetizadas en la estirpe no supresora

En la figura 38 se muestra el desarrollo de fago que tiene lugar después de la infección de B. subtilis MO-101-P su^{-} irradiada con luz UV durante 10.5

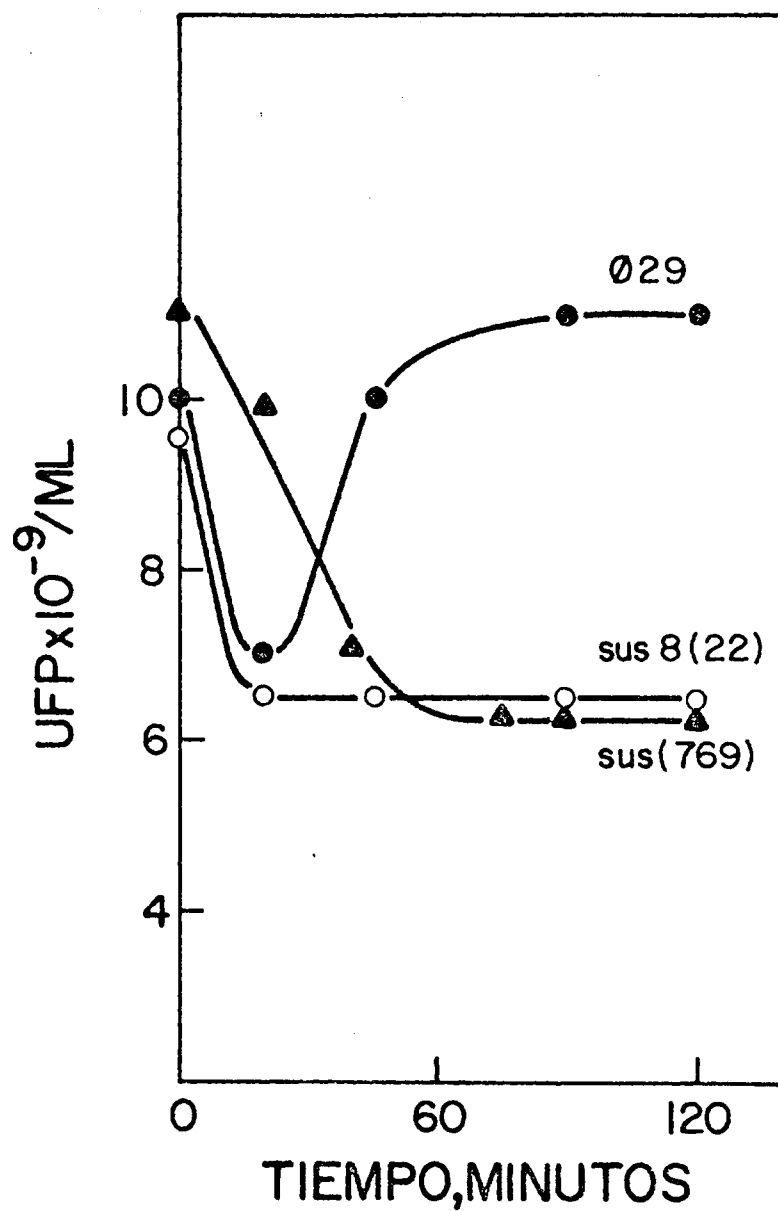


Figura 38. Desarrollo de fago en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22).

minutos, como se ha descrito (Métodos 10), con el fago normal y con los mutantes sus 8(769) y sus 8(22). Como puede apreciarse, los mutantes no pueden desarrollarse en la estirpe su⁻.

La figura 39 muestra el resultado de la coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe no supresora irradiada después de la infección con el mutante sus 8(769) (marcadas con leu-C¹⁴ de 15 a 60 minutos después de la infección y con el fago normal (marcadas con leu-H³ en el mismo tiempo). La figura 40 muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la infección de la estirpe su⁻ con el mutante sus 8(769) (marcadas con leu-C¹⁴ de 15 a 60 minutos después de la infección) y en la bacteria sin infectar (marcadas con leu-H³ en el mismo tiempo). La figura 41 presenta la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada calculada como se ha descrito anteriormente (97). La ausencia de las proteínas HP1 y HP3 en la bacteria infectada por el mutante, queda claramente establecida, como ya ha sido descrito en otras estirpes no supresoras (39,40).

La coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe su⁻ irradiada, después de la infección con el mutante sus 8(22) (marcadas con leu-C¹⁴

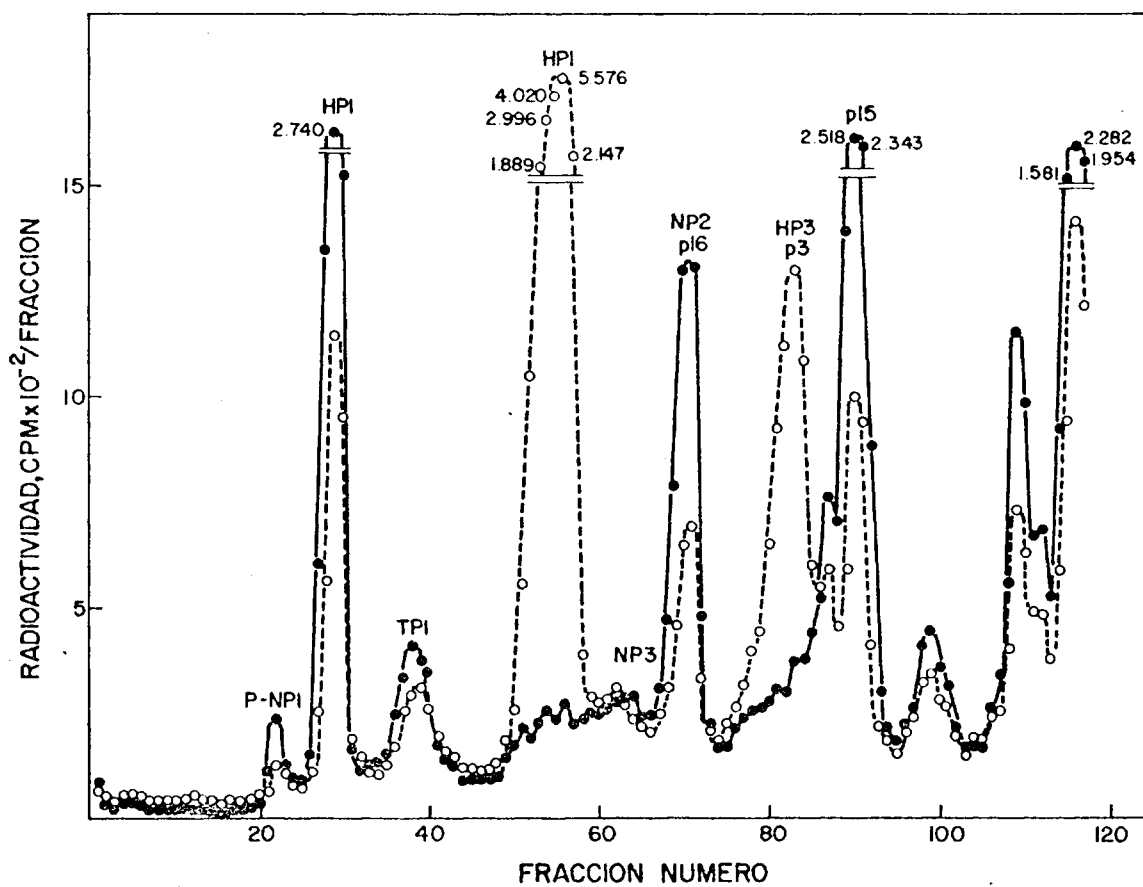


Figura 39. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o con ø29⁻ normal.

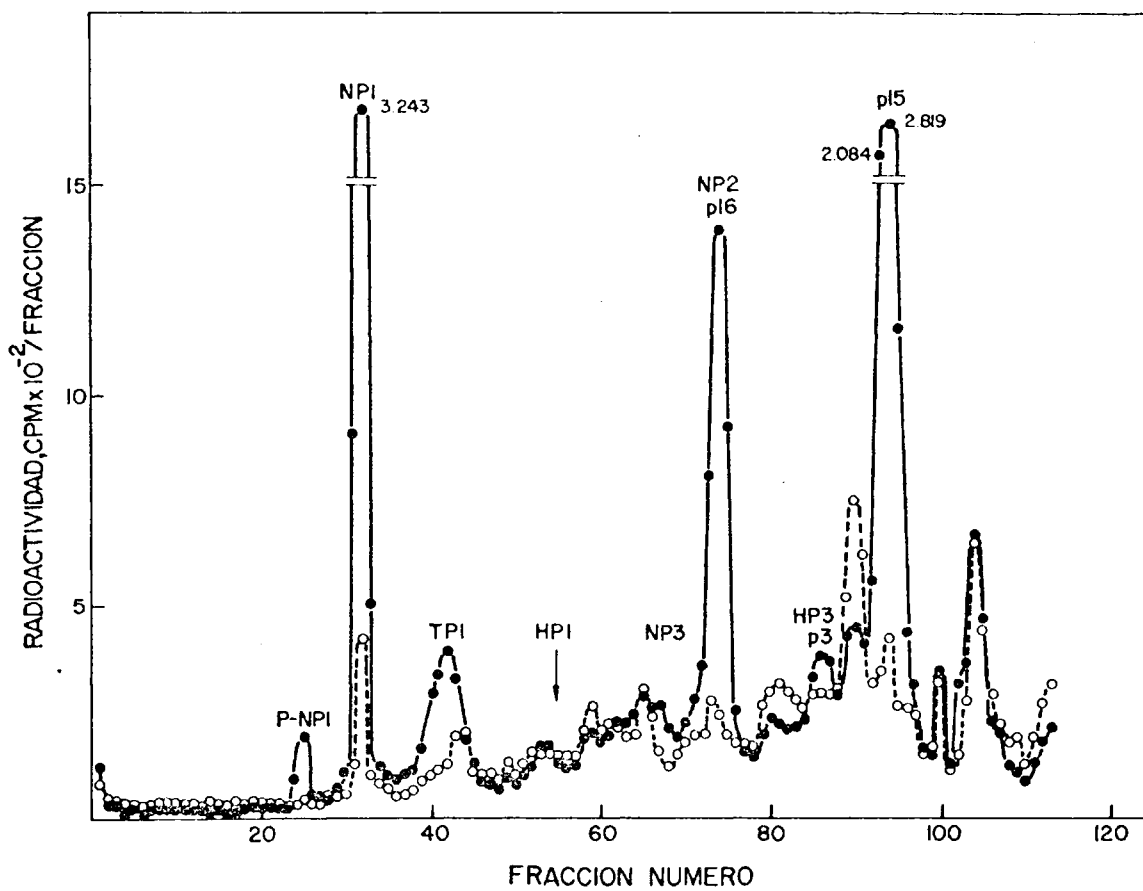


Figura 40. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o sin infectar.

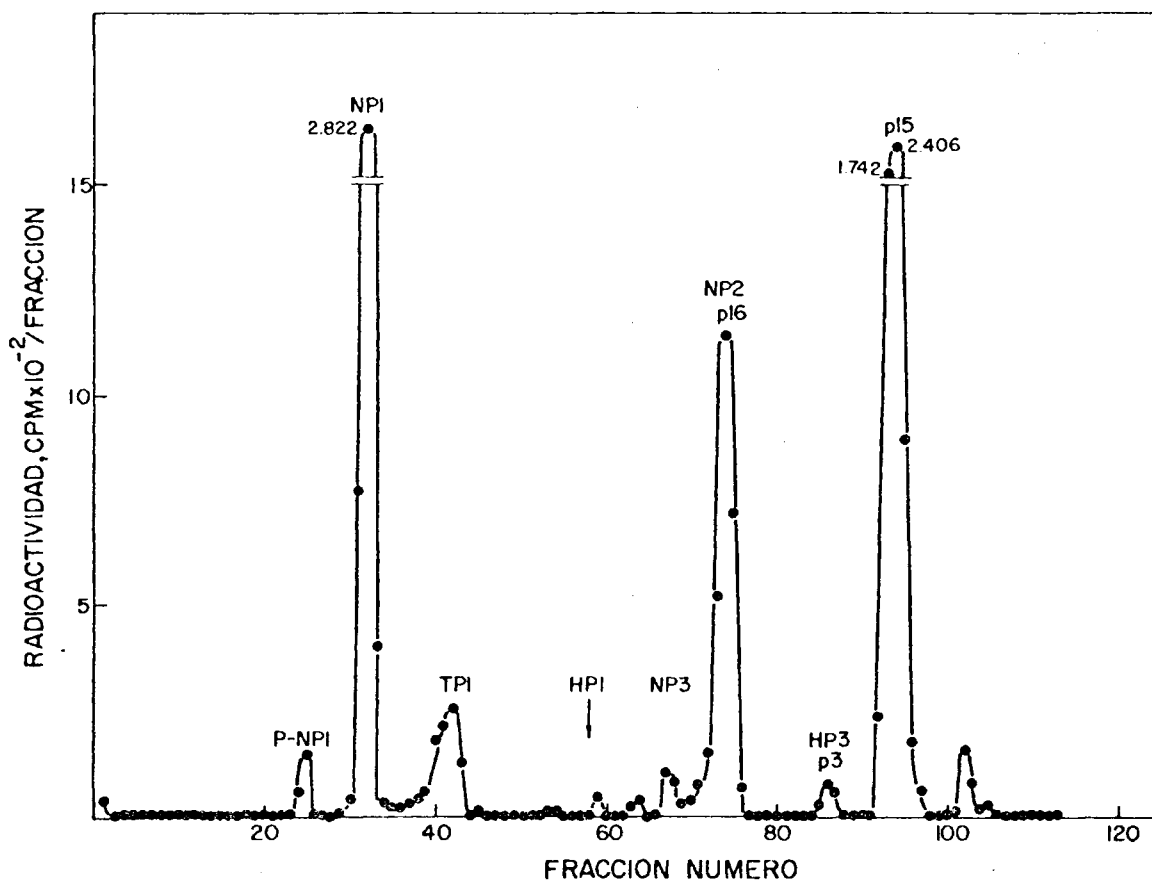


Figura 41. Radioactividad específica del mutante sus 8(769) en B. subtilis su⁻.

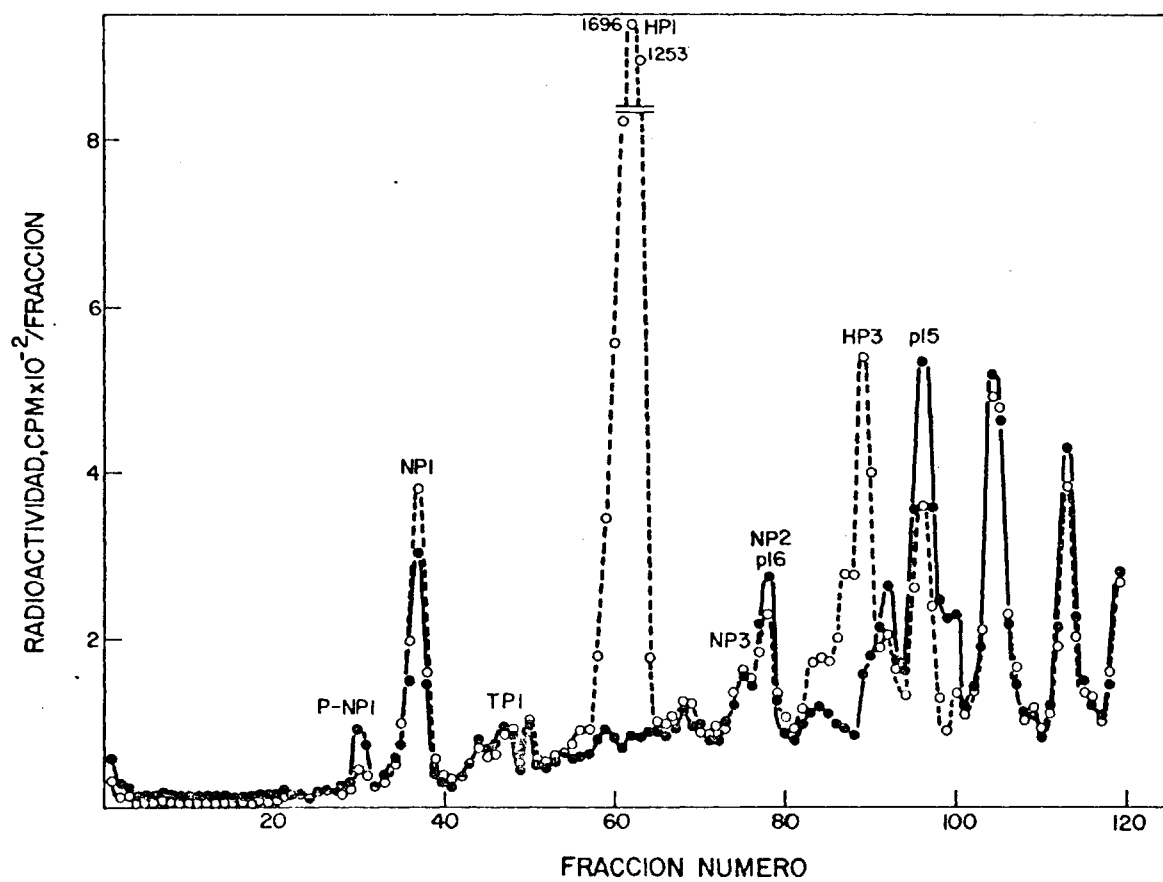


Figura 42. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o con ø29 normal.

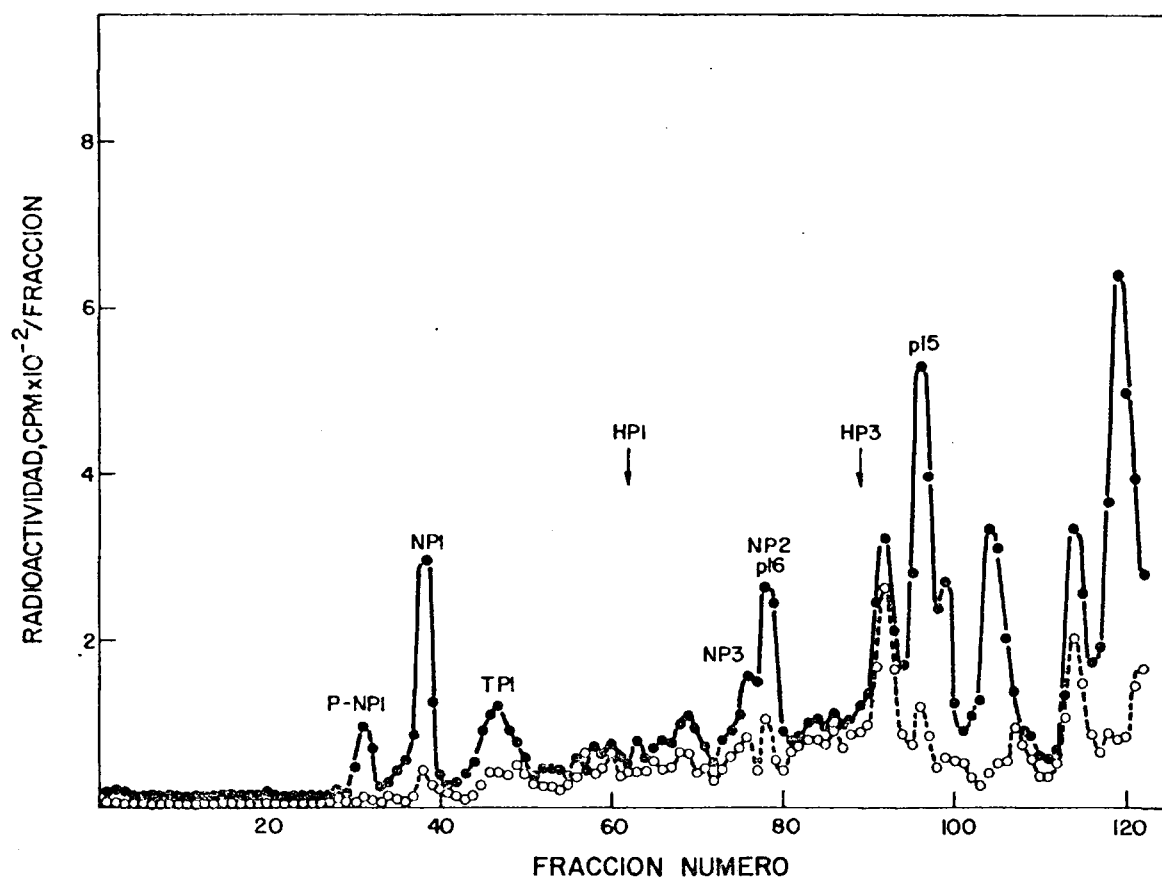


Figura 43. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o sin infectar.

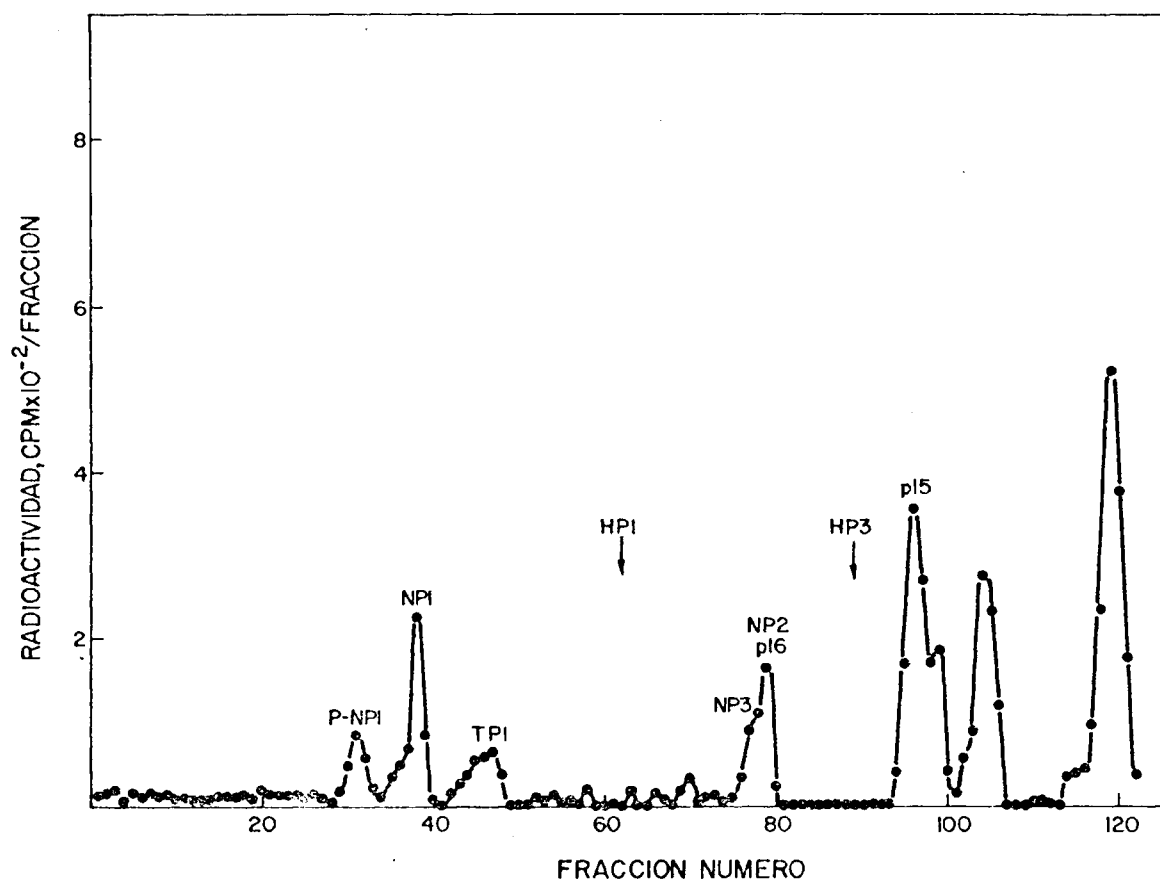


Figura 44. Radioactividad específica del mutante sus 8(22) en B. subtilis su⁻.

de 15 a 60 minutos después de la infección) y con el fago normal (marcadas con leu-H³ en el mismo tiempo), se muestra en la figura 42. La figura 43 muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la infección de la estirpe no supresora con el mutante sus 8(22) (marcadas análogamente con leu-C¹⁴) y en la bacteria sin infectar (marcadas con leu-H³ en el mismo tiempo). La radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada calculada como se ha descrito (97), se muestra en la figura 44. Análogamente a lo que ocurría en el caso del mutante sus 8 (769), se puede apreciar la ausencia de síntesis de las proteínas HP1 y HP3.

b) Proteínas sintetizadas en la estirpe supresora su⁺³

En la figura 45 se muestra el desarrollo de fago que tiene lugar después de la infección de B. subtilis M0-99 su⁺³, irradiado con luz UV durante 9 minutos (como se ha descrito Métodos 10), con el fago normal y con los mutantes sus 8(769) y sus 8(22). Puede apreciarse que a diferencia del fago normal y del mutante sus 8(769), el mutante sus 8(22), no puede desarrollarse en esta estirpe.

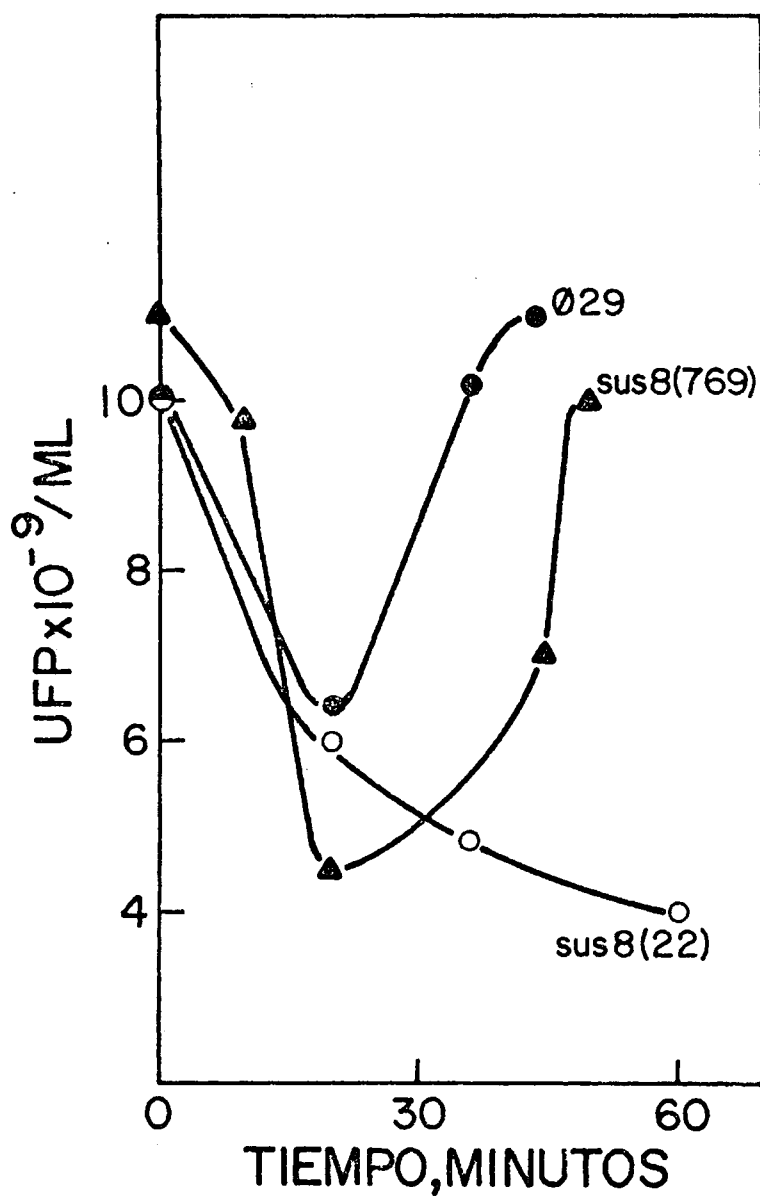


Figura 45. Desarrollo de fago en *B. subtilis* su⁺ irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22).

La figura 46 muestra el resultado de la coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe su^{+3} irradiada después de la infección con el mutante sus 8(769) (marcadas con leu- C^{14} , de 15 a 40 minutos después de la infección) y con el fago normal (marcadas con leu- H^3 en el mismo tiempo). La figura 47 muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la infección de la estirpe su^{+3} con el mutante sus 8(769) (marcadas análogamente con leu- C^{14}) y en la bacteria sin infectar (marcadas con leu- H^3 en el mismo tiempo). La figura 48 presenta la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97). Puede apreciarse la síntesis de pequeñas cantidades de las proteínas HP1 y HP3 cuando el mutante sus 8(769) infecta a B. subtilis su^{+3} . De la relación de HP1 y HP3, respectivamente, a la proteína p15 (39) sintetizadas en células infectadas por el fago normal y, de la misma relación en células infectadas por el mutante sus 8(769), se puede estimar una supresión de un 7% para HP1 y un 5% para HP3, valores que están en la orden del índice de supresión que se ha descrito para esta estirpe supresora (47).

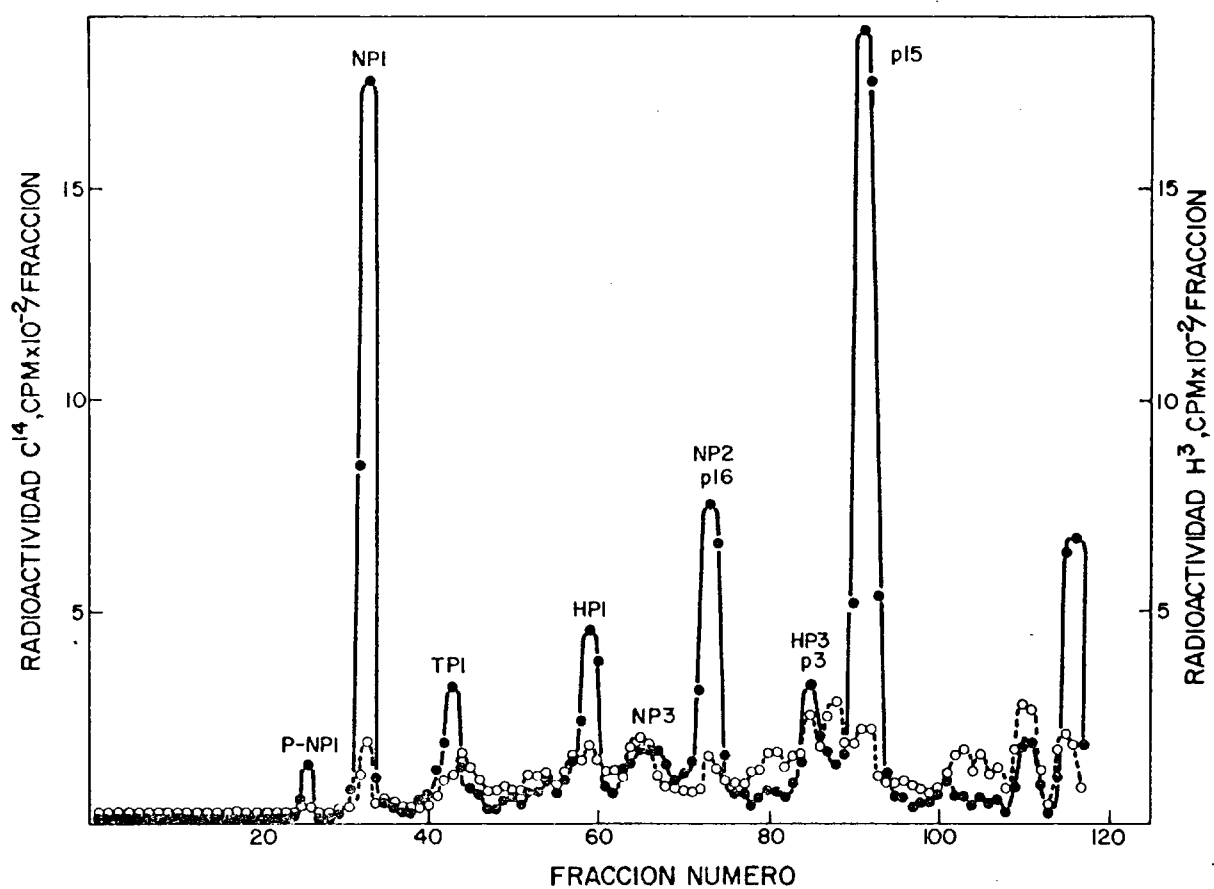


Figura 47. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o sin infectar.

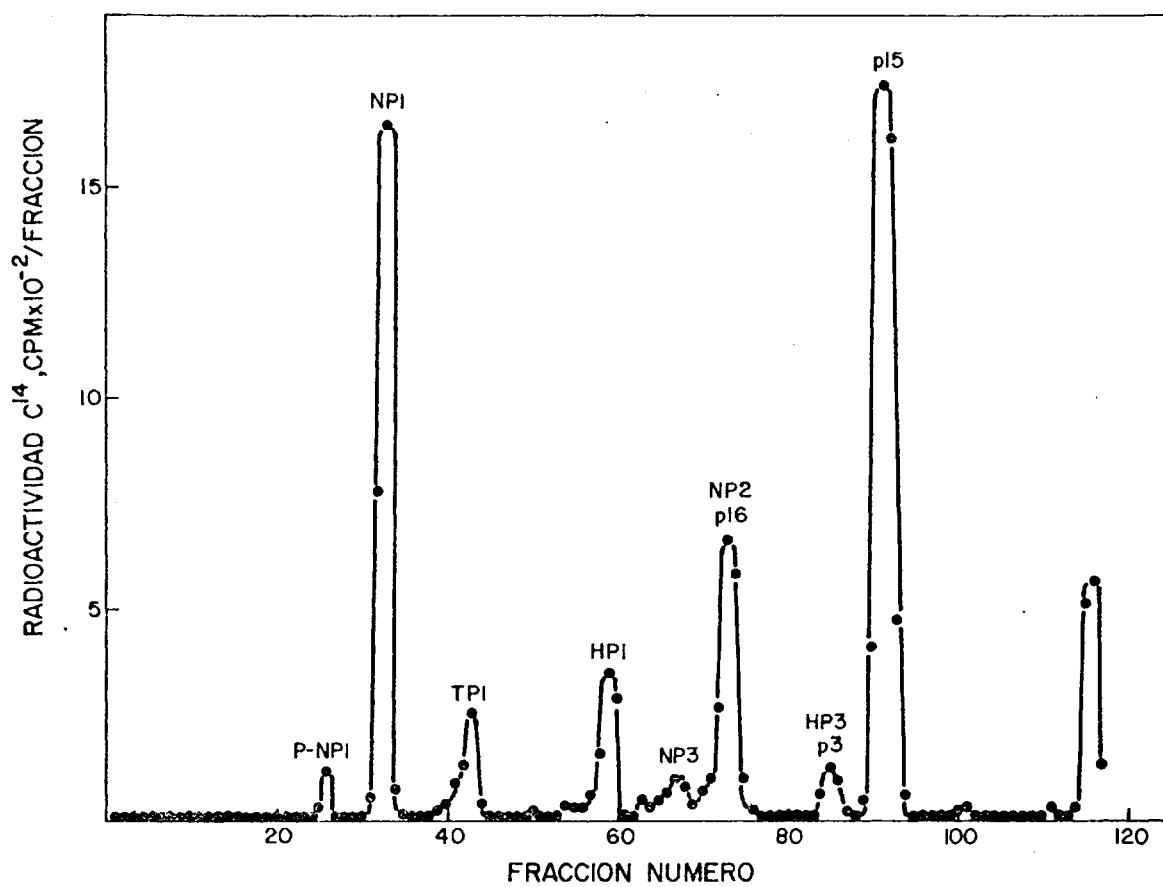


Figura 48. Radioactividad específica del mutante sus 8(769) en *B. subtilis* su^{+3} .

La coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe su^{+3} irradiada, después de la infección con el mutante sus 8(22) (marcadas con $leu-C^{14}$ de 15 a 40 minutos después de la infección) y con el fago normal (marcadas con $leu-H^3$ en el mismo tiempo), se presenta en la figura 49. La coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la infección de la estirpe su^{+3} con el mutante sus 8(22) (marcadas análogamente con $leu-C^{14}$) y en la bacteria sin infectar (marcadas con $leu-H^3$ en el mismo tiempo), se muestra en la figura 50. La radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97), se presenta en la figura 51. En este caso, se puede observar la síntesis de pequeñas cantidades de las proteínas HP1 y HP3 cuando el mutante sus 8(22) infecta a B. subtilis MO-99 su^{+3} . Siguiendo el mismo tipo de cálculo empleado en el caso del mutante sus 8(769), se puede determinar una supresión de aproximadamente un 10% para ambas proteínas, HP1 y HP3, un valor similar al obtenido para los mutantes sus 12(47), sus 15(212) (47), sus 8(769) y sus 12(610).

c) Proteínas sintetizadas en la estirpe supresora su^{+44}

La figura 52 muestra el desarrollo de fago que tiene lugar en la estirpe su^{+44} , irradiada con

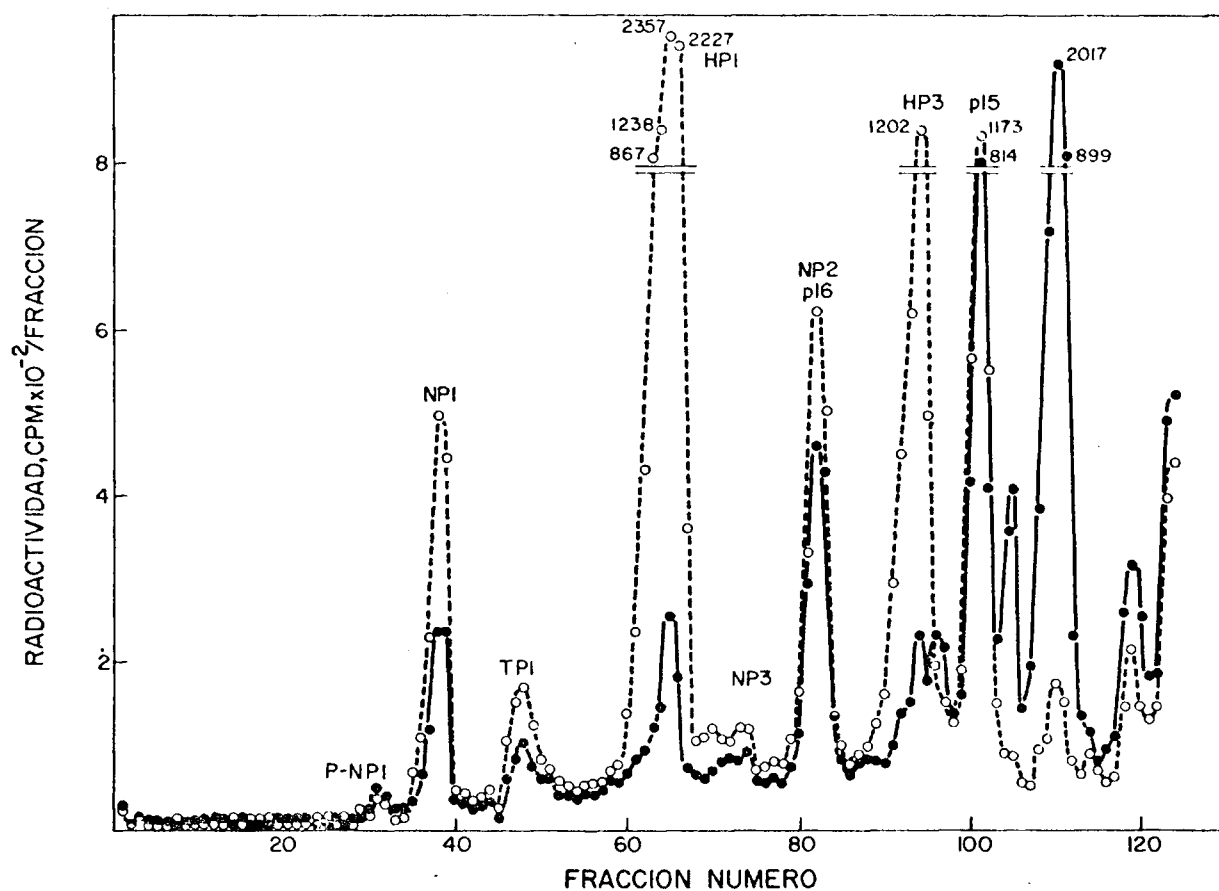


Figura 49. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o con Ø29 normal.

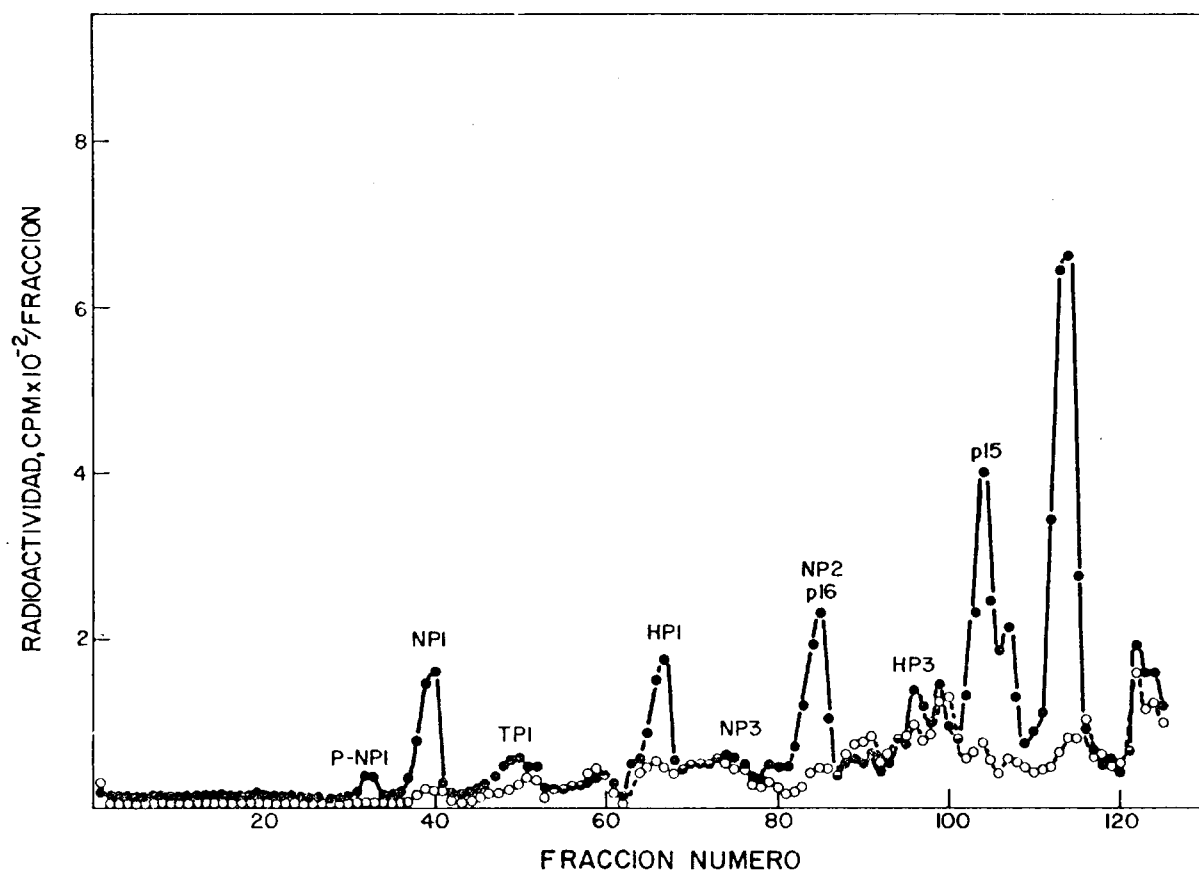


Figura 50. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o sin infectar.

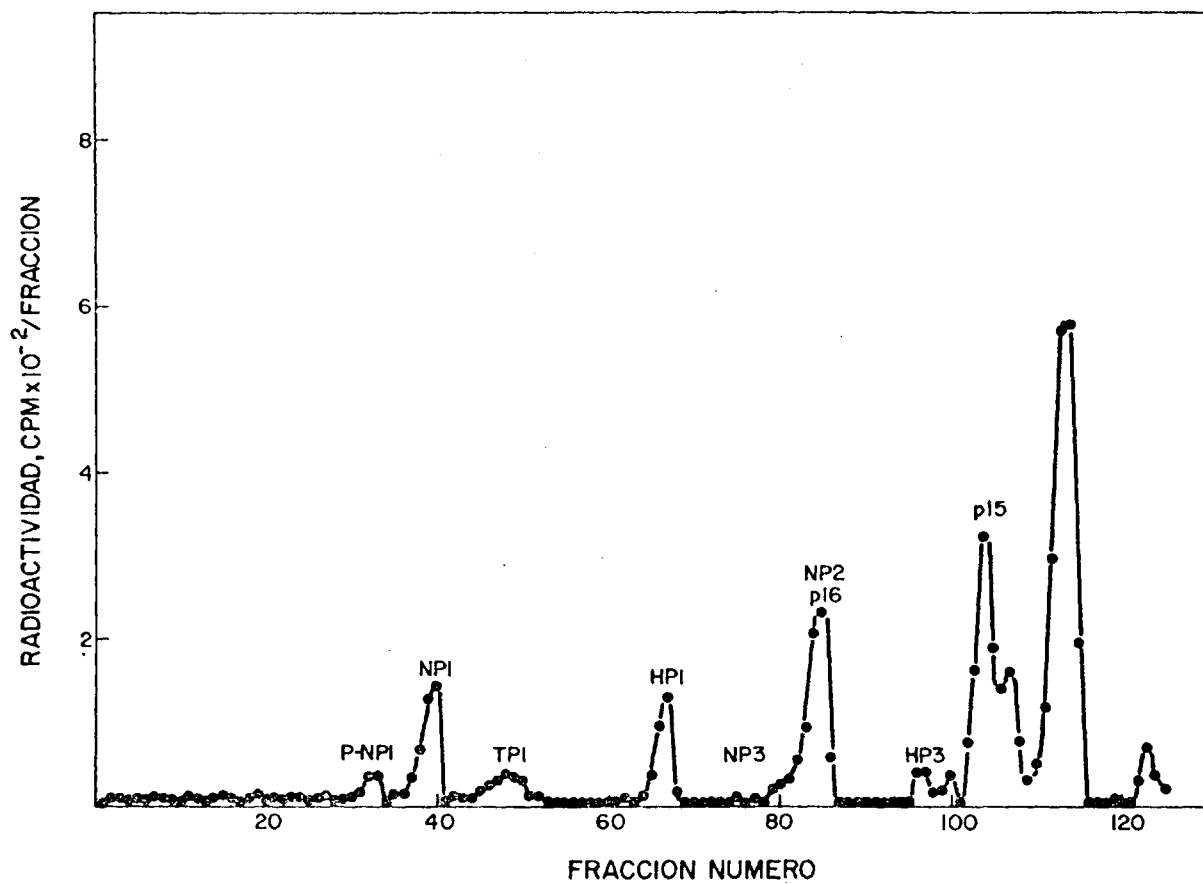


Figura 51. Radioactividad específica del mutante sus 8(22) en B. subtilis su⁺³.

luz UV durante 9 minutos, como se ha descrito (Métodos 10), cuando es infectada por el fago normal o por los mutantes sus 8(769) y sus 8(22). Tanto el fago normal como los dos mutantes sus, pueden desarrollarse perfectamente en esta estirpe supresora.

La figura 53 muestra el resultado de la coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe su⁺⁴⁴ irradiada, después de la infección con el mutante sus 8(769) (marcadas con leu-C¹⁴ de 15 a 60 minutos después de la infección) y con el fago normal (marcadas con leu-H³ el el mismo tiempo). En la figura 54 se muestra la coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la infección de la estirpe su⁺⁴⁴ con el mutante sus 8(769) (marcadas análogamente con leu-C¹⁴) y en la bacteria sin infectar (marcadas con leu-H³ en el mismo tiempo). La figura 55 presenta la radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97). Cuando el mutante sus 8(769) infecta a B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴, se puede apreciar la síntesis de las proteínas HP1 y HP3 en mayores cantidades que cuando el mutante infecta a B. subtilis MO-99 su⁺³, pudiéndose estimar en un cálculo idéntico al efectuado entonces (Resultados 8b), una supresión del 44% para HP1 y del 32% para HP3. -

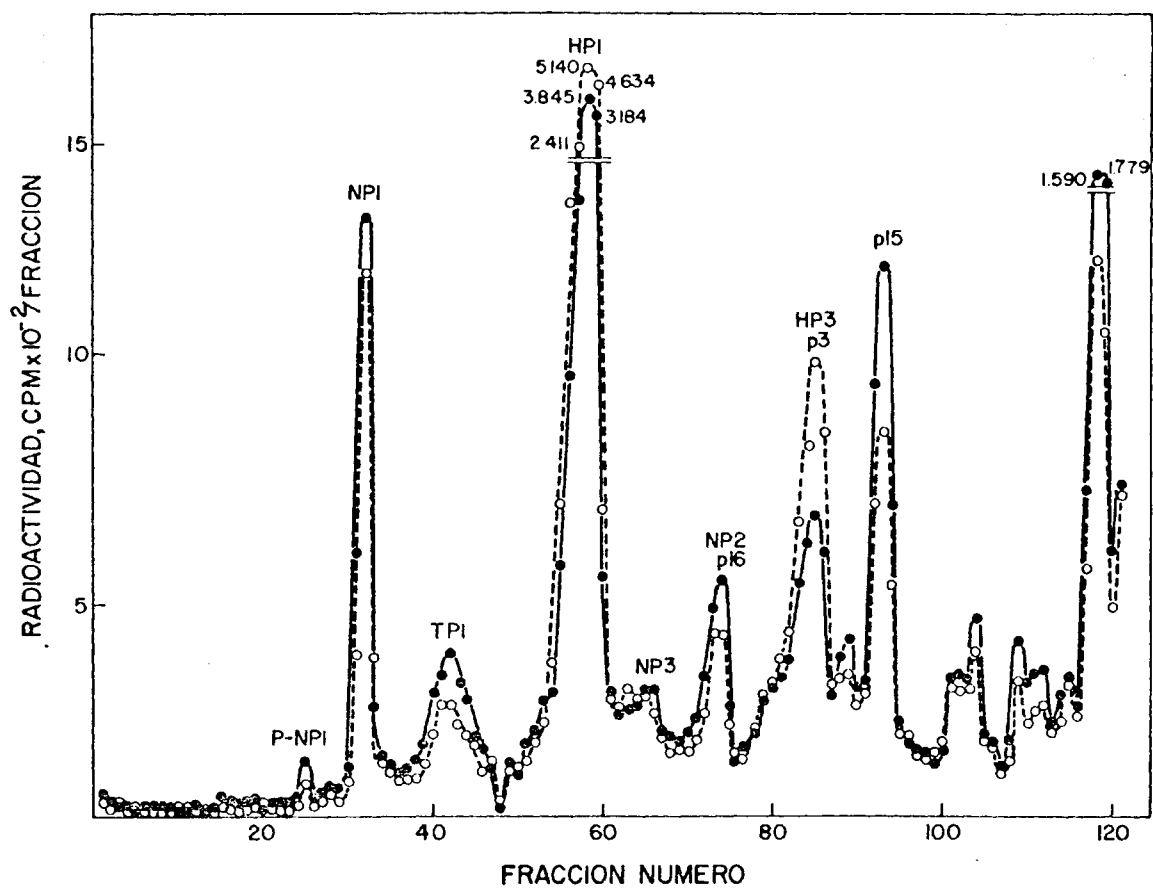


Figura 53. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o con ø29 normal.

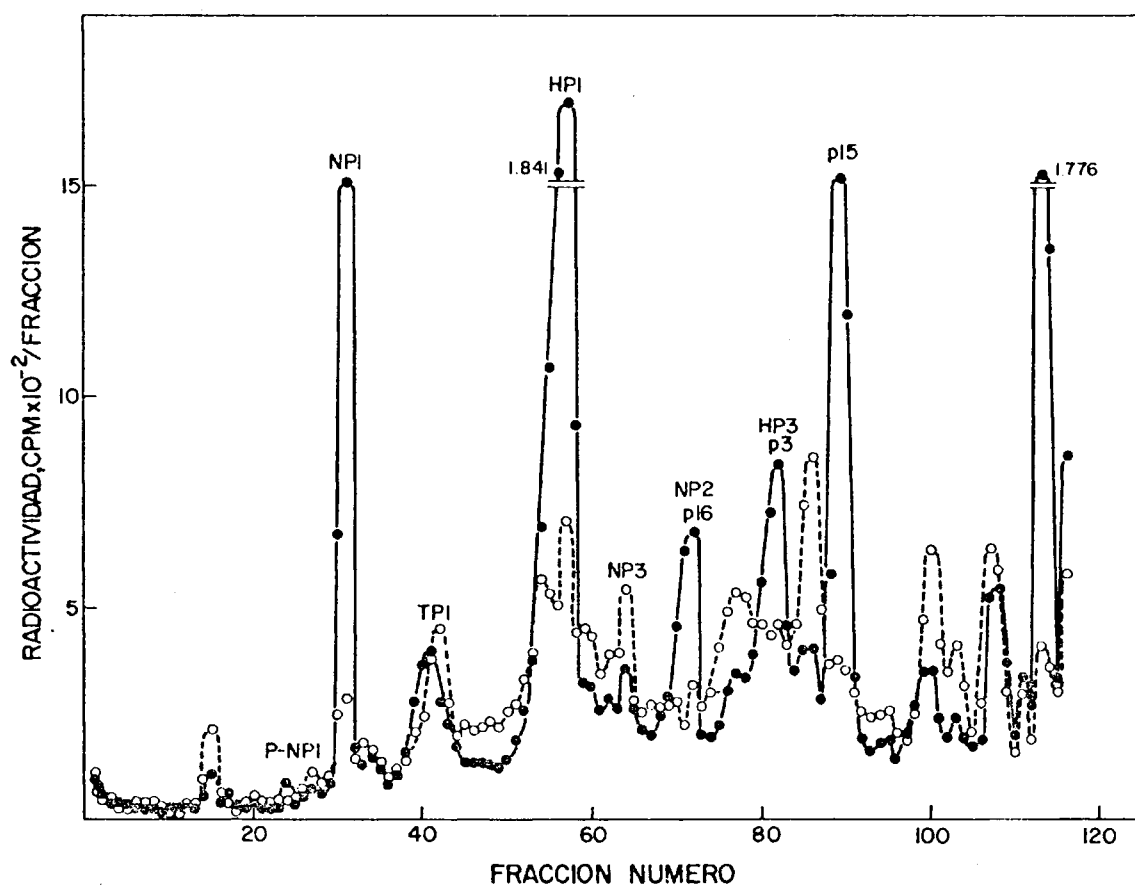


Figura 54. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o sin infectar.

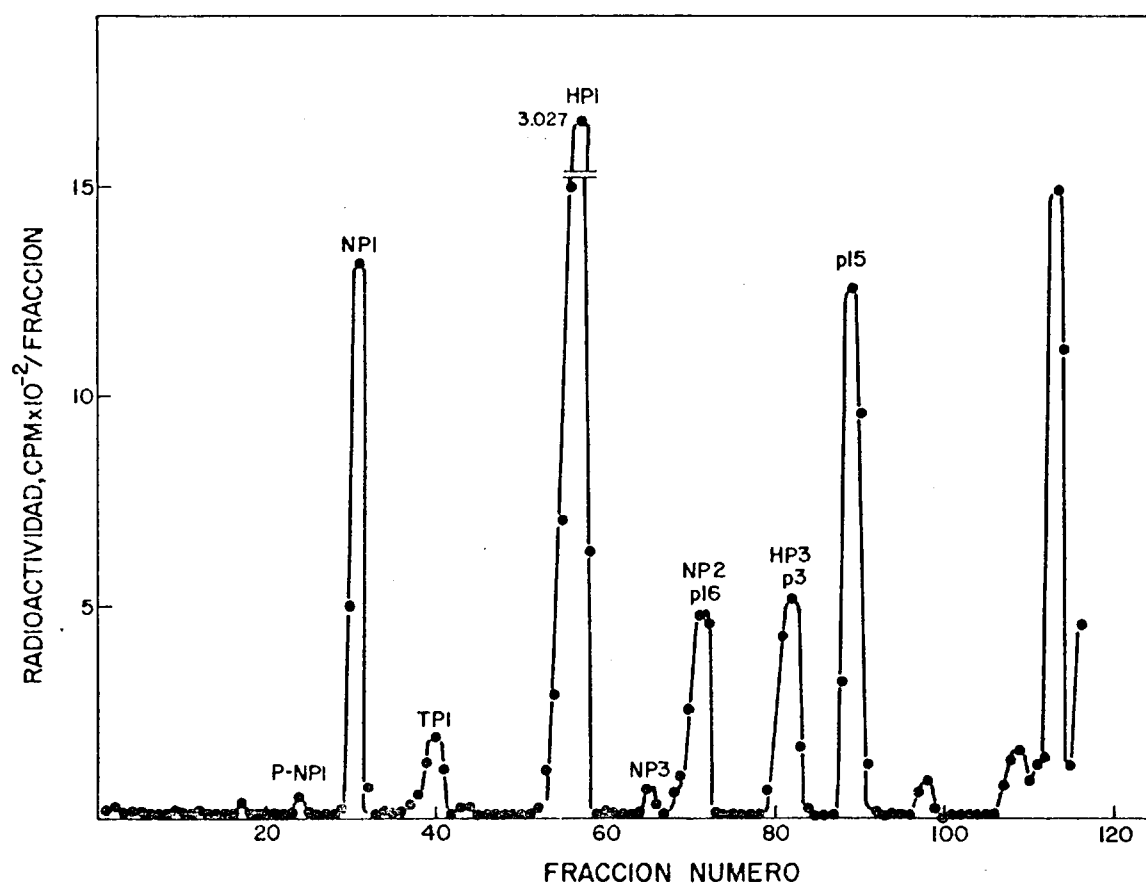


Figura 55. Radioactividad específica del mutante sus 8(769) en *B. subtilis* su⁺⁴⁴.

La coelectroforesis de las proteínas inducidas en la estirpe su^{+44} irradiada, después de la infección con el mutante sus 8(22) (marcadas con leu- C^{14} de 15 a 60 minutos después de la infección) y con el fago normal (marcadas con leu- H^3 en el mismo tiempo), se muestra en la figura 56. La coelectroforesis de las proteínas sintetizadas en la infección de la estirpe su^{+44} con el mutante sus 8(22) (marcadas análogamente con leu- C^{14}) y en la bacteria sin infectar (marcadas con leu- H^3 en el mismo tiempo), se muestra en la figura 57. La radioactividad específica del mutante en la bacteria infectada, calculada como se ha descrito (97), se presenta en la figura 58.

Como puede observarse, cuando el mutante sus 8(22) infecta a B. subtilis MO-101-P su^{+44} , tiene lugar la síntesis de mayores cantidades de las proteínas HP1 y HP3 que cuando infecta a B. subtilis MO-99 su^{+3} , y se puede estimar realizando el mismo cálculo que entonces (Resultados 8b), una supresión del 48% para HP1 y del 37% para HP3, valores que concuerdan con los obtenidos para el mutante sus 8(769) y que están en el orden de los encontrados con los mutantes sus 15(212) y sus 12(610), de un 64 y un 57% respectivamente (Resultados 4b y 6b).

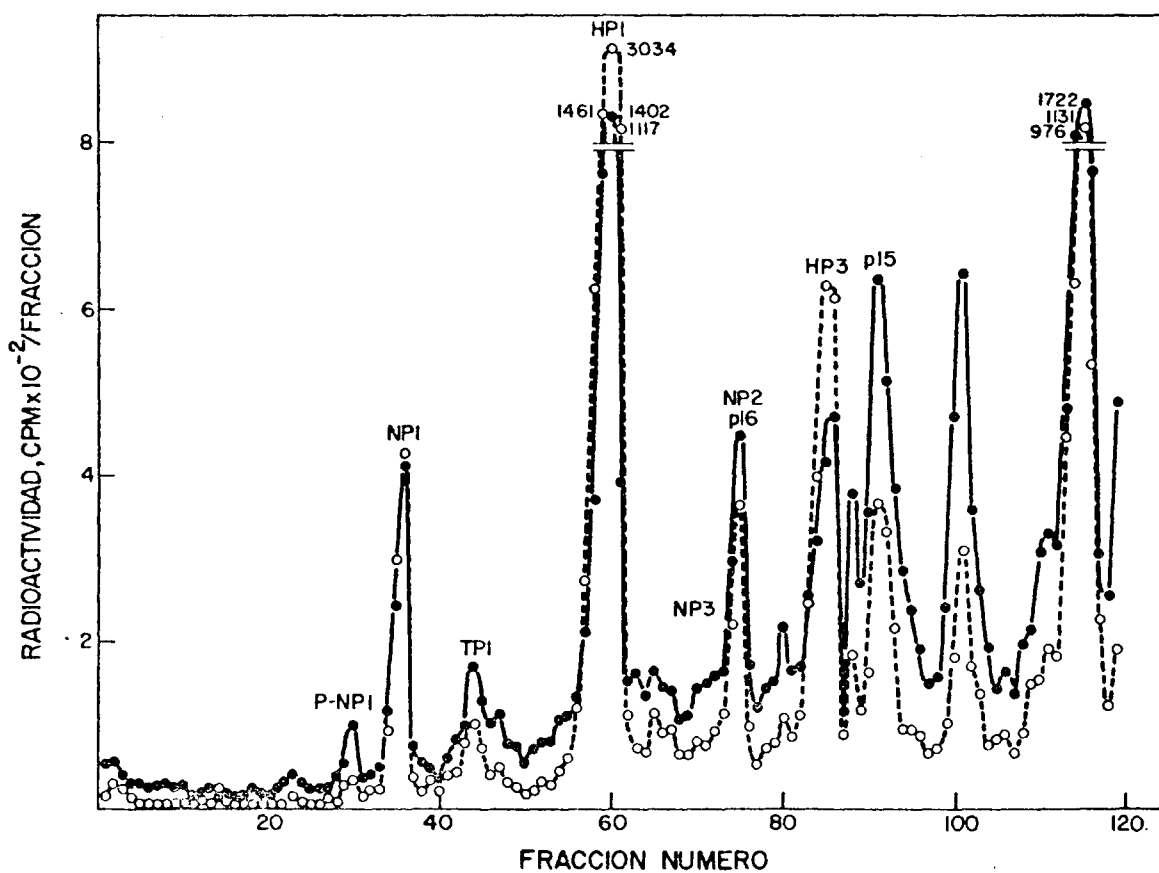


Figura 56. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o con ø29 normal.

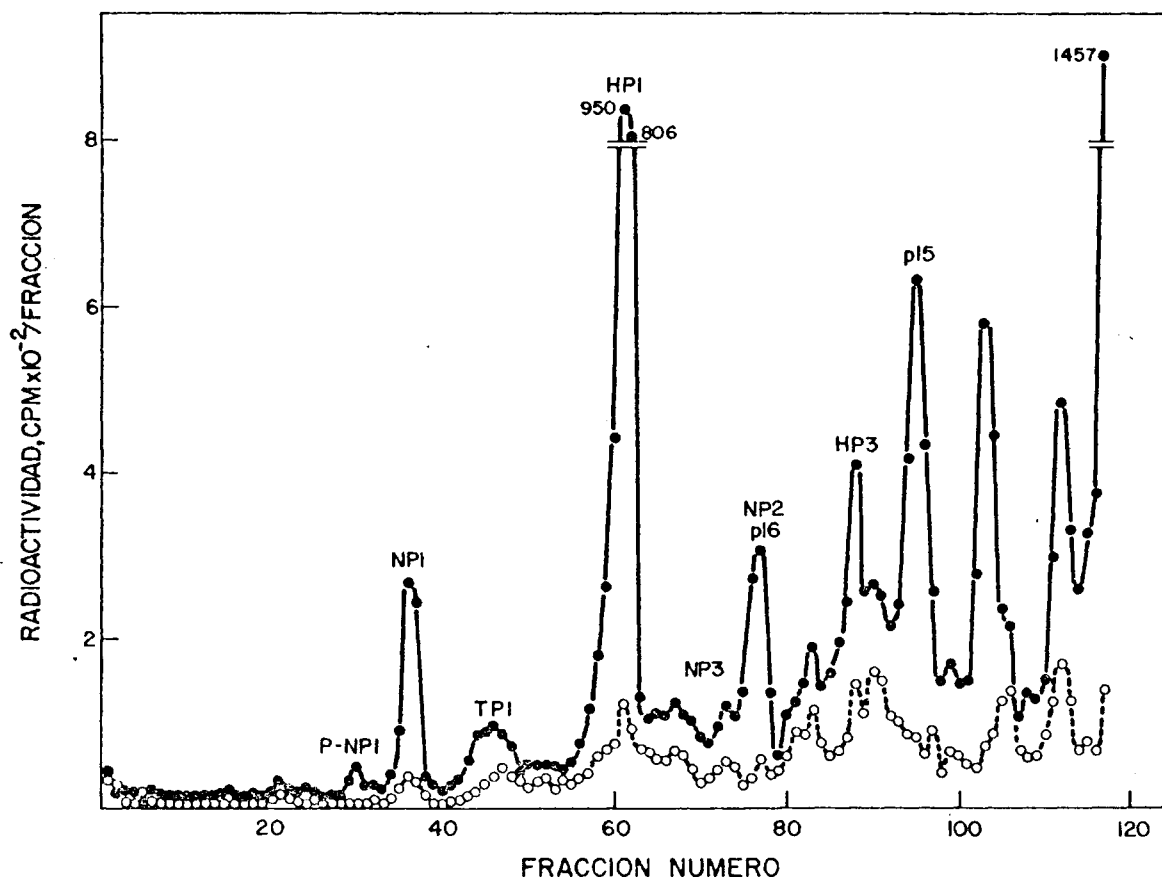


Figura 57. Electroforesis de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o sin infectar.

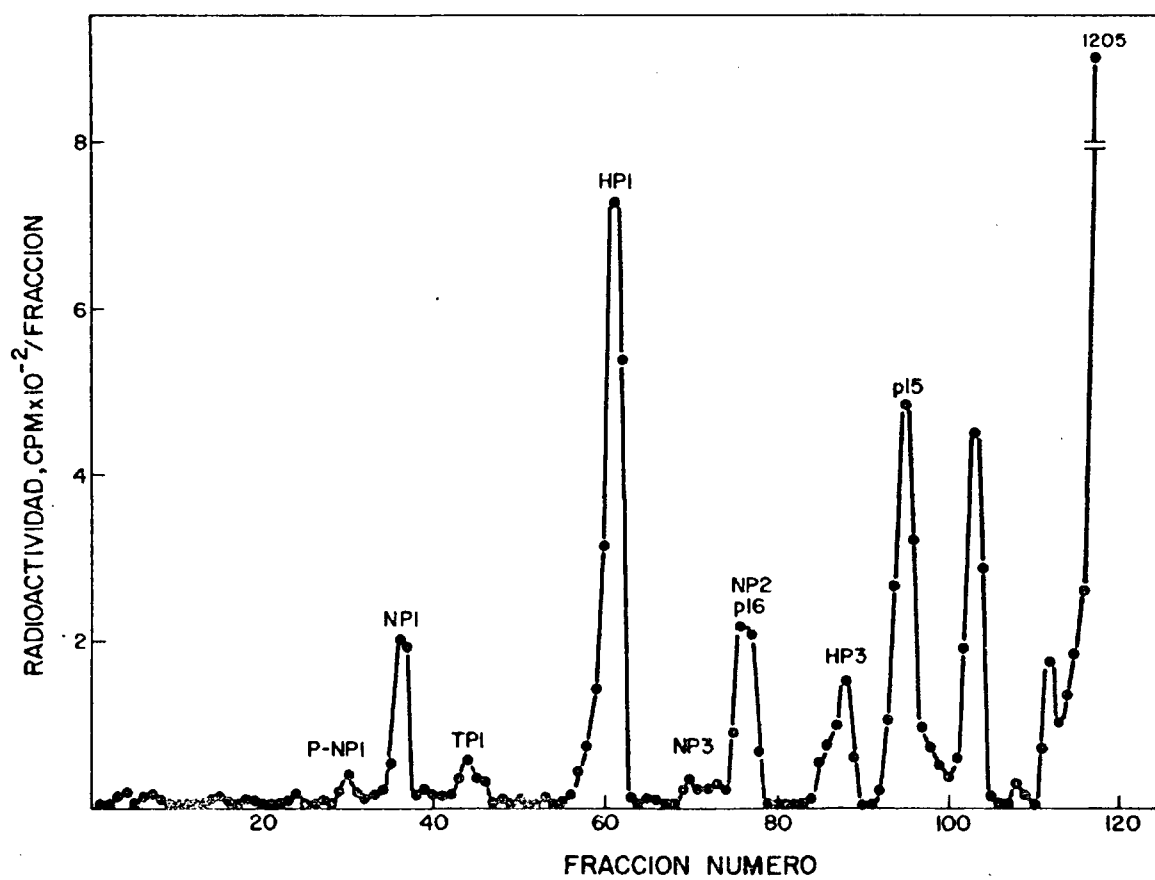


Figura 58. Radioactividad específica del mutante sus 8(22) en B. subtilis su^{+44} .

9) REVERTIENTES DEL MUTANTE SUS 8(22)

Los resultados obtenidos sugieren que la imposibilidad del mutante sus 8(22) para desarrollarse en B. subtilis MO-99 su⁺³, no es debida a que esta estirpe no pueda suprimir la mutación sus, puesto que a nivel de proteína sí lo hace, aunque el mutante no pueda desarrollarse en esta estirpe.

Este resultado es compatible con la posibilidad de que B. subtilis MO-99 su⁺³ contenga un supresor ocre y B. subtilis MO-101 su⁺⁴⁴ un supresor ambar, como anteriormente se ha expuesto. Si esto es así, el mutante sus 8(22) obtenido utilizando la estirpe su⁺⁴⁴ debe ser ambar y a partir de él, se podrían obtener revertientes que fueran ocre, para lo cual basta que ocurra espontaneamente una transición G→A en el triplete sin sentido. Estos revertientes ocre, serían suprimidos teóricamente por la estirpe su⁺³ y no lo serían por la estirpe su⁺⁴⁴. Ahora bien, si el aminoácido que inserta la estirpe su⁺³ hace no funcional a la proteína, (como se desprende de los resultados obtenidos), los revertientes ocre tampoco podrían desarrollarse en la estirpe su⁺³, de tal manera, que sobre esta estirpe sólo se podrán obtener revertientes al tipo normal, que podrán desarrollarse

en la estirpe su^- y en las dos estirpes supresoras, su^{+3} y su^{+44} .

Con objeto de comprobar esta posibilidad, se procedió a aislar revertientes del mutante sus 8(22) de la siguiente manera: El mutante sus 8(22) se plasmó sobre la estirpe B. subtilis MO-99 su^{+3} a una dilución apropiada de acuerdo con la frecuencia de reversión del mutante y de manera que se obtuvieran 100 placas de lisis por placa Petri. Análogamente a lo realizado en el caso del mutante sus 12(47) (Resultados 5), 500 placas de lisis independientes, así obtenidas, se replicaron con palillos estériles sobre placas Petri previamente sembradas con B. subtilis 110NA su^- y con B. subtilis MO-99 su^{+3} y en este orden, con el fin de seleccionar aquellos revertientes que pudieran desarrollarse en la estirpe su^{+3} y no en la su^- .

De los 500 revertientes que se aislaron a partir del mutante sus 8(22) y que podían desarrollarse en B. subtilis su^{+3} , no hubo ninguno que no pudiera desarrollarse en B. subtilis 110NA su^- , es decir, no hubo ninguno que fuera mutante sus, siendo todos ellos revertientes al tipo normal. Este resultado es compatible, por tanto, con la posibilidad de que la estirpe

supresora su^{+3} sea capaz de suprimir el triplete sin sentido presente en el mutante sus 8(22), aunque el desarrollo del mutante pueda no tener lugar.

10) PROTEINAS INDUCIDAS POR INFECCION DE B. SUBTILIS
MO-99 su^{+3} CON LOS MUTANTES SUS 16(121) Y SUS
16(172)

Para comprobar si otros mutantes sus aislados en B. subtilis MO-101-P su^{+44} que no podían desarrollarse en B. subtilis MO-99 su^{+3} , resultaban suprimidos por esta última estirpe a nivel de proteína, se estudiaron los mutantes sus 16(121) y sus 16(172). La proteína producto de este cistrón, p16, sólo se resuelve de la proteína NP2 en electroforesis en placa (39); por ello, las proteínas inducidas por infección con estos dos mutantes, fueron estudiadas utilizando este sistema de separación, como se ha descrito en Métodos 12b).

La figura 59 muestra desarrollo de fago que tiene lugar al infectar B. subtilis MO-99 su^{+3} , irradiado con luz UV durante 9 minutos como se ha descrito (Métodos 10), con el fago normal y con los mutantes sus 16(121) y sus 16(172). Como puede apreciarse, sólo el fago normal puede desarrollarse.

Para estudiar la síntesis de las proteínas inducidas por los mutantes sus 16(121) y sus 16(172) y por el fago normal en la infección de la estirpe su⁺³ irradiada, se tomaron alícuotas de los cultivos infectados marcados con leucina-C¹⁴ del minuto 15 al 35 después de la infección, se lisaron y se disociaron las proteínas para someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida en placa (Métodos 11b). La autorradiografía de las placas de electroforesis y las densitometrías de la mismas, se realizaron como se ha descrito en Métodos 12b.

Las figuras 60A y 61A muestran la densitometría correspondiente a la autoradiografía de la electroforesis de las proteínas presentes en las bacterias infectadas por el fago normal. La figura 60B presenta la densitometría correspondiente a las bacterias infectadas con el mutante sus 16(121) y la figura 61B, la densitometría de las bacterias infectadas con el mutante sus 16(172). La densitometría correspondiente a las células sin infectar se muestra en las figuras 60C y 61C.

Como puede apreciarse en la figura 60B, la síntesis de la proteína p16 tiene lugar en pequeña cantidad, cuando el mutante sus 16(121) infecta a

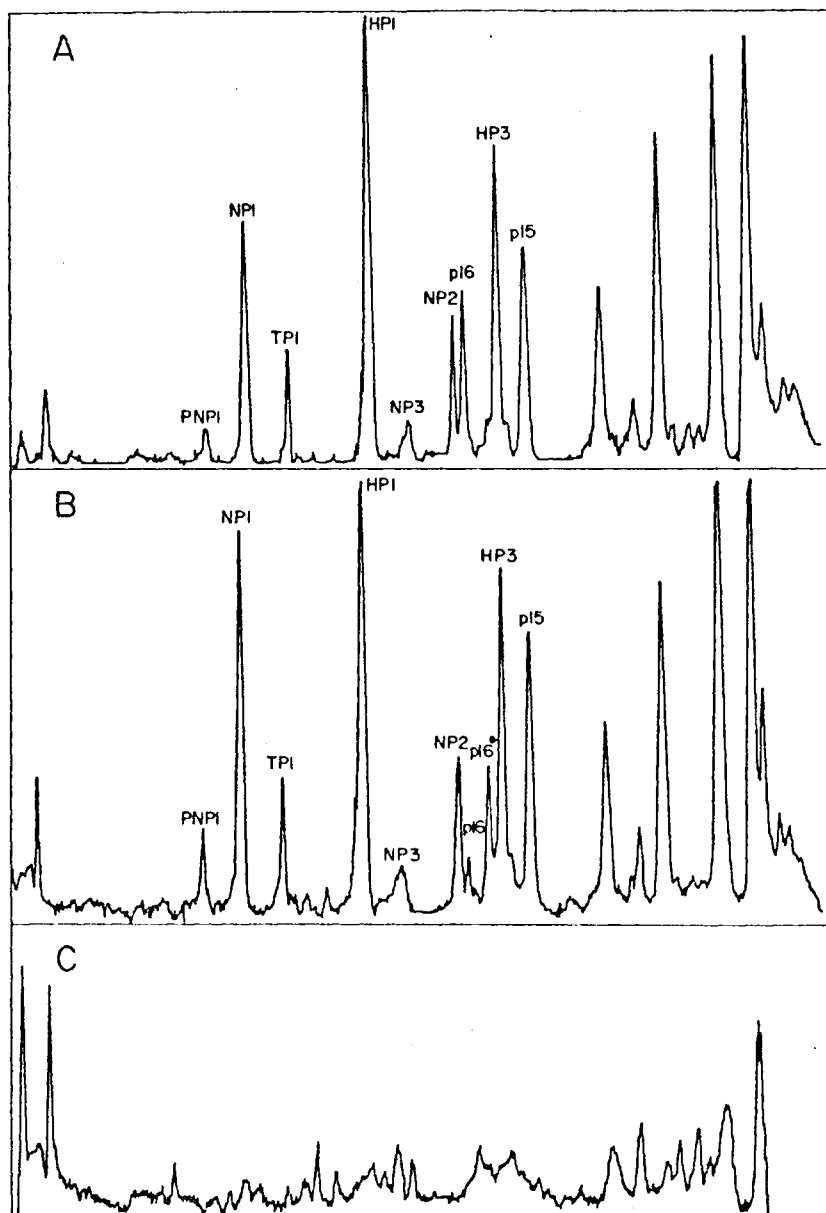


Figura 60. Densitometria de las proteínas inducidas en *B. subtilis* su⁺ irradiado e infectado con el mutante sus 16(121).

B. subtilis MO-99 su⁺³, apareciendo un pico en la misma posición que en células infectadas por el fago normal (figura 60A), pico que está ausente en células sin infectar (figura 60C).

En la figura 60B puede apreciarse además, la existencia de un pico de peso molecular inferior al de p16, que no aparece en células infectadas por el fago normal ni en sin infectar y que podría tratarse de un fragmento de p16 (p16*).

Tanto de la relación de proteínas p16 a NP2 en células infectadas con el mutante sus 16(121), respecto a la misma relación en células infectadas con fago normal, como de la relación de proteína p16 al presunto fragmento de p16 (p16*) en células infectadas por el mutante sus 16(121), se puede calcular una supresión alrededor de un 20%. La determinación de la supresión en este caso, es mucho menos precisa que en el caso de los experimentos en que las células infectadas se marcan con diferente isótopo que las células sin infectar, ya que es más difícil cuantificar la contribución de las proteínas sintetizadas en la bacteria sin infectar.

La infección de B. subtilis MO-99 su⁺³ con el mutante sus 16(172) (figura 61B) produce resultados similares, con la excepción de que el presunto fragmento (p16*) está ausente en este caso. De la relación de proteína p16 a NP2 en bacterias infectadas por el mutante sus 16(172) respecto a la misma relación en células infectadas por el fago normal, se puede calcular, en este caso, una supresión de aproximadamente un 10%.

Estos resultados confirman la posibilidad de que el aminoácido insertado por la estirpe B. subtilis MO-99 su⁺³ pueda impedir el desarrollo de un mutante determinado por hacer a la proteína no funcional, aunque la supresión a nivel de proteína realmente tenga lugar.

11) MUTANTES SUS EN EL CISTRON 8

En la tabla XVI se muestran los resultados de la recombinación intracistrónica realizada por cruces de dos factores, como se ha descrito (Métodos 18a, utilizando B. subtilis su⁺⁴⁴ como estirpe supresora), de los mutantes sus en el cistrón 8, obtenidos por mutagénesis de Ø29 con nitrosoguanidina (Resultados 7), y de los representantes de grupo en este

Tabla XVI. Recombinación intracistrónica de los mutantes sus en el cistrón 8 obtenidos por mutagénesis con NG.

<u>Cruce</u>	<u>Unidades de recombinación</u>
ts8(93) x sus8(769)	0,4
ts8(93) x sus8(22)	0,2
ts8(93) x sus8(2050)	0,4
ts8(93) x sus8(254)	0,39
ts8(93) x sus8(2431)	0,2
ts8(93) x sus8(207)	0,41
ts8(93) x sus8(10)	0,37
sus8(769) x sus8(22)	0,15
sus8(769) x sus8(2050)	0,025
sus8(769) x sus8(254)	0,05
sus8(769) x sus8(2431)	0,16
sus8(769) x sus8(207)	<0,01
sus8(769) x sus8(10)	0,02
sus8(22) x sus8(207)	0,14
sus8(22) x sus8(254)	0,13

La estirpe supresora utilizada fue B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴. La recombinación se realizó como se describe en Métodos 18a.

cistrón de las colecciones de Reilly y col. (50) (mutante sus 8(769)), y de Talavera y col. (42) (mutante ts 8(93)).

Como puede apreciarse de estos resultados, los mutantes se encuentran localizados en, o próximamente a la posición definida por el mutante sus 8(769); tan sólo dos mutantes, sus 8(22) y sus 8(2431) (que son incapaces de desarrollarse en B. subtilis su⁺³), se localizan a la derecha del mutante sus 8(769), aproximadamente a 0.15 unidades de recombinación. En la tabla V (Resultados 1c) se presentó el resultado del cruce entre los mutantes sus 8(769) y ts 8(93) llevado a cabo utilizando B. subtilis su⁺³ como estirpe supresora. Como puede observarse, la distancia entre estos dos mutantes es de 0.8 unidades de recombinación, distancia que es doble de la encontrada entre los mismos mutantes cuando la estirpe supresora utilizada fué B. subtilis su⁺⁴⁴. Es evidente que los sistemas de recombinación en ambas estirpes son diferentes y que la eficiencia de la estirpe su⁺⁴⁴ en recombinación es aproximadamente un 50% de la eficiencia de la estirpe su⁺³. Teniendo en cuenta esta diferencia, se podría aproximar la distancia entre el mutante sus 8(769) y los mutantes

sus 8(22) y sus 8(2431) a 0.3 unidades de recombinación si la estirpe utilizada como supresora hubiera sido B. subtilis su⁺³.

Los mutantes sus en el cistrón 8 (de las diferentes colecciones), son incapaces de sintetizar en condiciones restrictivas las proteínas HP1 y HP3, como ha sido descrito (40) y como se ha mostrado en Resultados 8a en el caso de los mutantes sus 8(769) y sus 8(22) (figuras 39 a 41 y 42 a 44, respectivamente). Por otra parte las proteínas HP1 y HP3 pueden tener péptidos trípticos comunes (98). Ambos resultados, podrían sugerir que las proteínas HP1 y HP3 se sintetizan en forma de una proteína precursora que después es procesada específicamente para producir ambos polipéptidos. Sería un caso similar al descrito (41), del precursor de la proteína que forma los apéndices del cuello de Ø29 (P-NP1), que da lugar a la proteína NP1 y una proteína de bajo peso molecular (39,40). No obstante, si la proteína precursora de HP1 y HP3 existe, su presencia no ha sido detectada hasta el momento.

Otra posible interpretación para el hecho de que los mutantes sus en el cistrón 8 sean incapaces de sintetizar proteínas HP1 y HP3 en condiciones

restrictivas, sería la existencia de un efecto polar de la mutación sus en el cistrón 8 (que codificaría una de las dos proteínas) sobre otro cistrón situado a la derecha del 8 (que codificaría la otra proteína) y en el que aún no se ha obtenido ningún mutante sus. Sería un caso similar al efecto polar descrito para los cistrones 10 y 11 (49).

La obtención de nuevos mutantes sus en el cistrón 8 (o en el cistrón situado a su derecha) y el estudio de las proteínas inducidas en la infección de B. subtilis 110NA su⁻ con estos nuevos mutantes, permitiría comprobar si alguna de las dos posibilidades (proteína precursora, o efecto polar) es correcta.

Con este objeto se abordó la obtención de mutantes sus de Ø29 en el cistrón 8 mediante mutagénesis in vitro.

12) MUTANTES SUS DE Ø29 EN EL CISTRON 8 OBTENIDOS
POR MUTAGENESIS IN VITRO

Los tratamientos mutagénicos empleados para aislar mutantes sus de Ø29 integrados en las diferentes colecciones, se realizaron sobre partículas de fago completas cuando fueron in vitro, utilizando ácido nitroso, trietilen melamina, etilmetano sulfonato e hidroxí-

lamina como agentes mutagénicos, o sobre el DNA en replicación cuando fueron in vivo, utilizando nitrosoguanidina, trietilen melamina y 5-bromodeoxiuridina como agentes mutagénicos (38,40, 49, 50).

Con objeto de permitir una acción más eficiente del agente mutagénico, se utilizaron el fragmento EcoRI-A del DNA de $\phi 29$ y el DNA lineal de $\phi 29$ en solución y, como agentes mutagénicos, ácido nitroso, hidroxilamina y nitrosoguanidina. Los tratamientos mutagénicos se llevaron a cabo como se indica en Métodos 22.

El fragmento EcoRI-A del DNA de $\phi 29$ abarca aproximadamente la mitad izquierda del genoma del fago, extendiéndose desde el cistrón 1 al 9 como se ha comprobado por rescate de marcadores (68). La utilización de este fragmento del DNA de $\phi 29$ permitirá obtener mutaciones sólo en la región del genoma comprendida entre sus dos extremos.

La utilización del doble mutante sus 4(56)-ts 8(93) (obtenido como se describe en Métodos 20) en el procedimiento de selección por rescate de marcadores (Métodos 23a), permitirá seleccionar sólo aquellos mutantes sus que no sean termosensibles y que se hayan rescatado por sobrecruzamientos que han tenido lugar

a la derecha del marcador ts 8(93). La selección por complementación cualitativa (Métodos 23b) permitirá escoger aquellos mutantes sus que lo sean exclusivamente en el cistrón 8.

Con objeto de evitar que mutaciones muy próximas al marcador sus 9(422) pudieran perderse en la selección por rescate de marcadores, debido a la débil eficiencia con que este marcador es rescatado por el fragmento EcoRI-A del DNA de Ø29, el DNA lineal de Ø29 se mutagenizó igualmente y los mutantes sus fueron seleccionados de la misma forma, para obtener mutantes sus exclusivamente en el cistrón 8.

La tabla XVII muestra los mutantes en el cistrón 8 obtenidos con cada agente mutagénico y utilizando DNA lineal de Ø29 o el fragmentt EcoRI-A en la mutagénesis. Estos mutantes se obtuvieron de un total de 20.000 placas de lisis individuales comprobadas.

La tabla XVIII muestra los resultados de la complementación cuantitativa, llevada a cabo como se describe en Métodos 17b, de los mutantes sus en el cistrón 8 con los representantes de grupo sus 8(769) y ts 8(93), como control de complementación negativa,

Tabla XVII. Mutantes sus de Ø29 en el cistrón 8 obtenidos por mutagénesis in vitro.

<u>DNA mutagenizado</u>	<u>Mutantes obtenidos</u>	<u>Agente mutagénico</u>			<u>Número de mutantes</u>
		<u>NA</u>	<u>HG</u>	<u>NG</u>	
Fragmento EcoRI-A	NA20011, NA50011, NA50012	6	0	0	6
	NA7221, NA7222, NA90011				
DNA lineal	NA71 HA23	1	1	—	2

Los mutantes obtenidos por tratamiento con ácido nitroso llevan el prefijo NA, los obtenidos con hidroxilamina, el prefijo HA. Las siglas NG representan al tratamiento mutagénico llevado a cabo con nitrosoguanidina. Todos los mutantes son de origen independiente. Los tratamientos mutagénicos se llevaron a cabo como se describe en Métodos 22a-c.

Tabla XVIII. Complementación cuantitativa de los mutantes sus de Ø29 en el cistrón
8 aislados por mutagénesis in vitro.

	NA20011	NA50011	NA50012	NA7221	NA7222	NA71	HA23	ts8(93)	sus4(56)
	(0,03)	(0,014)	(0,005)	(0,18)	(0,02)	(0,15)	(0,04)	(0,04)	(0,03)
sus8(769)									
(0,01)	0,02	0,016	0,007	0,07	0,05	0,03	0,06	0,03	40
ts8(93)									
' (0,04)	0,07	0,04	0,02	0,04	0,01				66

Los números entre paréntesis corresponden a los índices de complementación individual.
La complementación se realizó como se describe en Métodos 17b.

y sus 4(56), como control de complementación positiva. El mutante NA-90011 se identificó como perteneciente al cistrón 8 por complementación cualitativa exclusivamente.

La tabla XIX muestra los resultados de la localización genética de los mutantes sus en el cistrón 8 llevada a cabo por cruces de dos factores utilizando B. subtilis su⁺³ como estirpe supresora (Métodos 18a). Como puede apreciarse, todos los mutantes sus obtenidos, se localizan muy próximos al marcador sus 8(769), coincidiendo con él, o a su izquierda. No se obtuvo ningún mutante que se localizara entre los marcadores ts 8(93) y sus 9(422).

13) PROTEINAS INDUCIDAS POR INFECCION DE B. SUBTILIS
110NA SU⁻ CON LOS MUTANTES SUS EN EL CISTRON 8
AISLADOS POR MUTAGENESIS IN VITRO

Para estudiar la síntesis de las proteínas inducidas por los mutantes sus 8(22), sus 8(20011), sus 8(50011), sus 8(50012), sus 8(7221), sus 8(7222), sus 8(90011), sus 8(71) y por el fago normal en la infección de la estirpe B. subtilis 110NA su⁻ irradiada con luz UV durante 7.5 minutos como se ha descrito

(Métodos 10), se tomaron alícuotas de los cultivos infectados marcados con leucina- C^{14} del minuto 28 al 35 después de la infección e incubados durante dos minutos adicionales, con un exceso de 100 veces de leucina fría; las bacterias infectadas se lisaron y las proteínas se disociaron para someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida en placa (Métodos 11b). La autorradiografía de la placa de electroforesis se realizó como se ha descrito en Métodos 12b. Se llevó como control. Un cultivo sin infectar marcado en las mismas condiciones. La figura 62 (A y B) muestra el desarrollo de fago que tiene lugar en la infección de B. subtilis 110NA su⁻ irradiada con los mutantes sus en el cistrón 8 arriba citados y con el fago normal. Como puede apreciarse sólo el fago normal es capaz de desarrollarse.

La figura 63 muestra la autorradiografía de la placa de electroforesis de las proteínas presentes en las bacterias infectadas por el fago normal y por los mutantes sus en el cistrón 8 arriba citados, así como de las proteínas presentes en la bacteria sin infectar. Puede apreciarse la ausencia de síntesis de las proteínas HP1 y HP3 en todos los mutantes en el cistrón

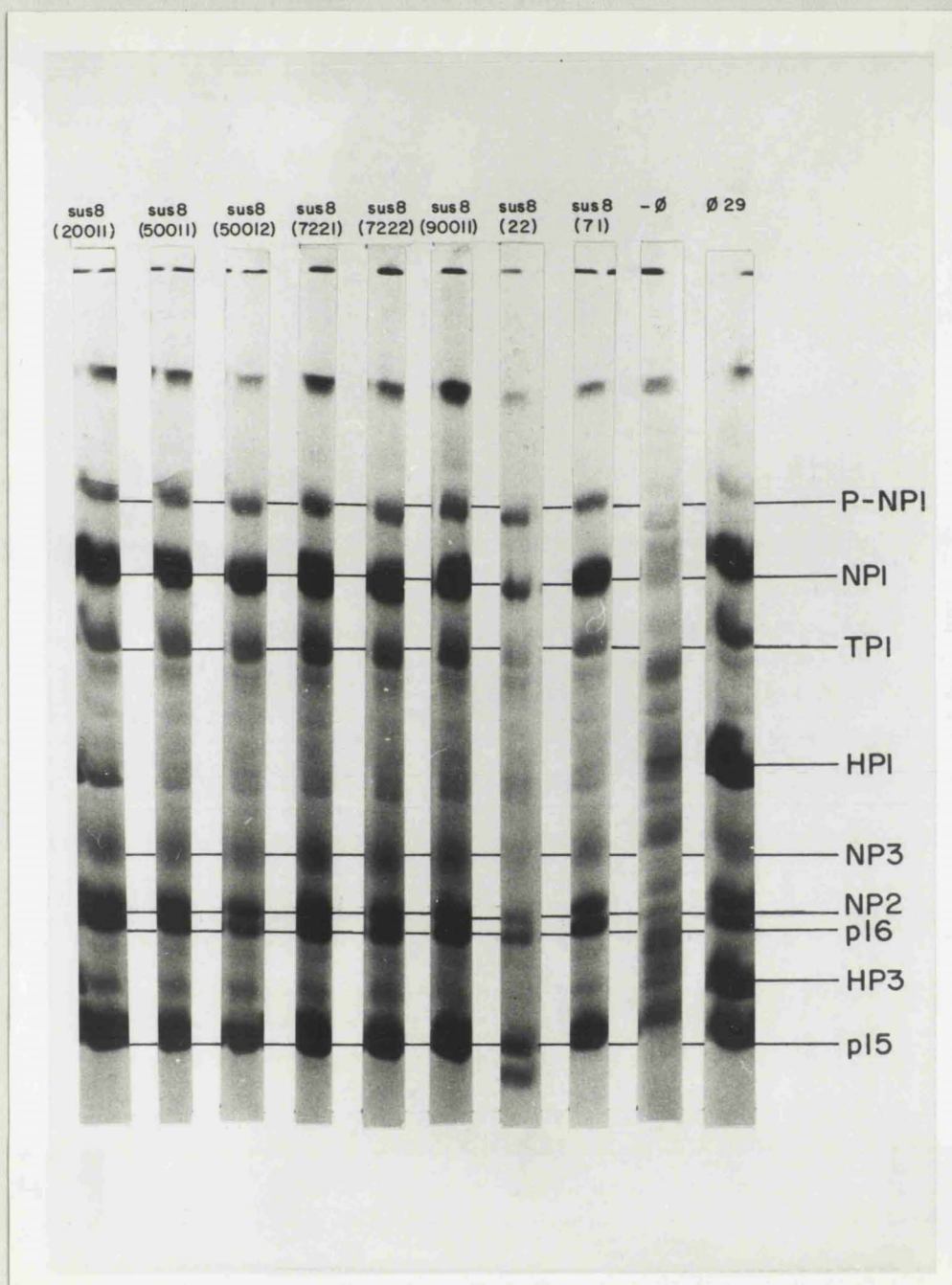


Figura 63. Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por mutantes *sus* en el *cis*-trón 8.

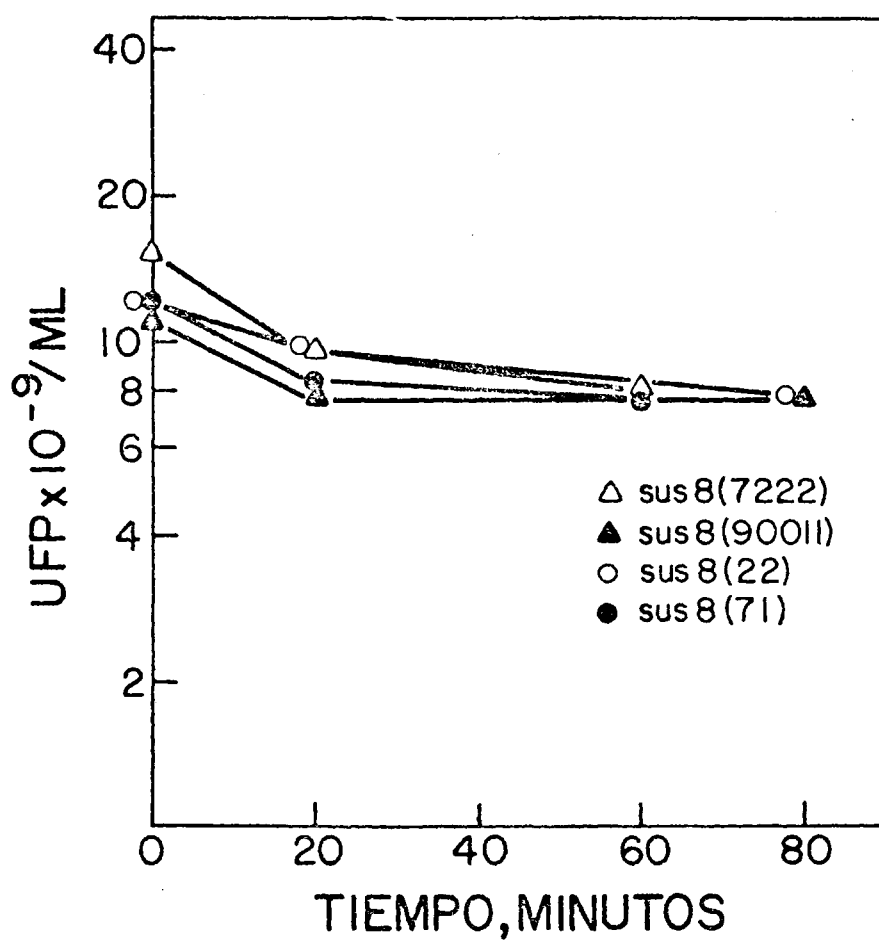


Figura 62B. Desarrollo de fago en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con Ø29 normal o con mutantes sus en el cistrón 8.

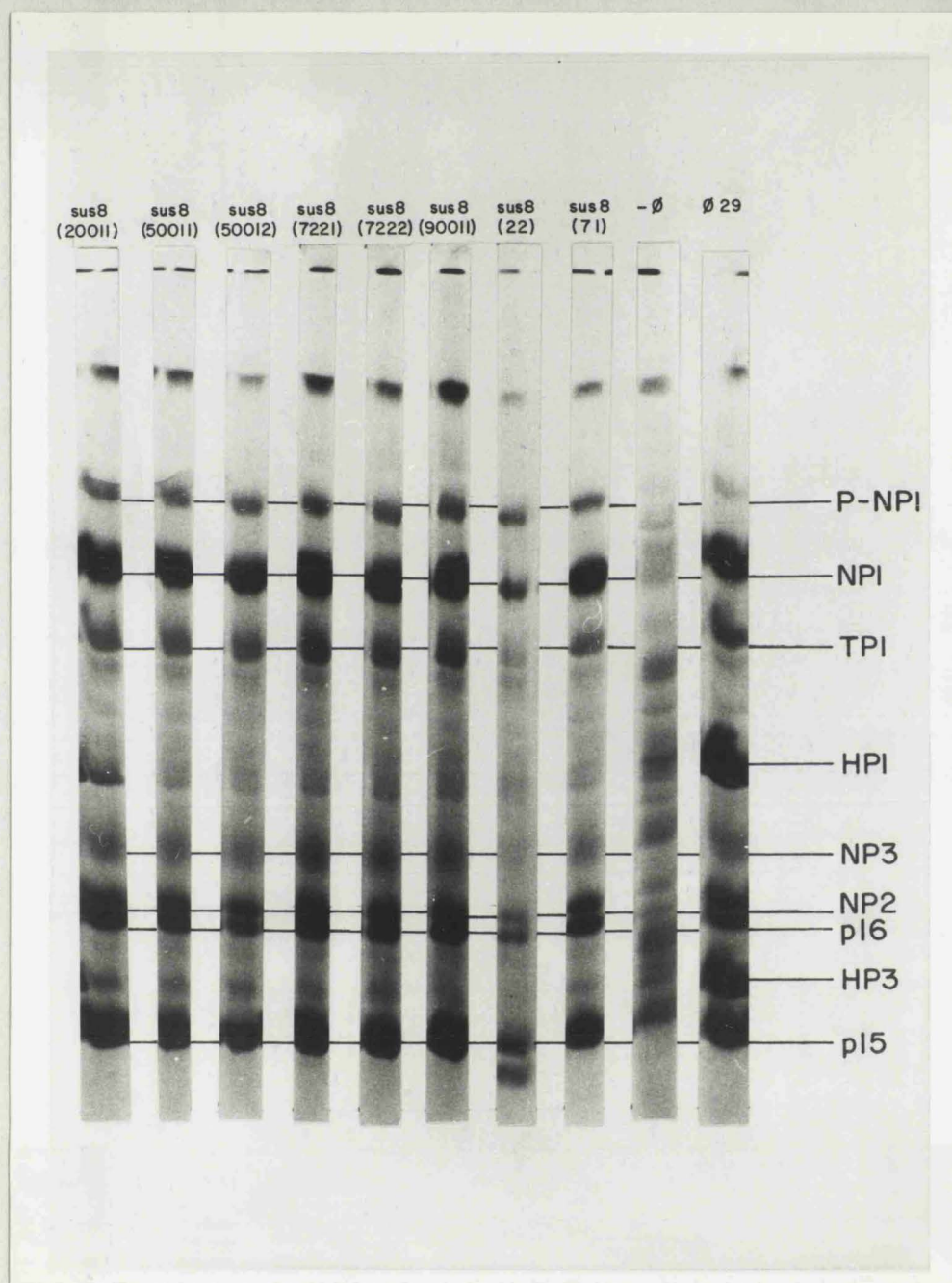


Figura 63. Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por mutantes *sus* en el *cis*-trón 8.

8, análogamente a lo que ocurría en el caso de las proteínas sintetizadas en la infección de B. subtilis MO-101-P su⁻ con los mutantes sus 8(769) y sus 8(22) (Resultados 8a) y de acuerdo con la localización genética de estos mutantes.

14) MUTANTES SUS A25, SUS G10, SUS H1 Y SUS 7(614)

Los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1 fueron originalmente aislados por el Dr. B.E. Reilly a partir del mutante sus 14(1241) por mutagénesis in vivo con bromodeoxiuridina. Estos mutantes poseían por tanto la mutación de lisis retrasada respecto al fago normal al igual que el fago paterno y mostraron, además, modificaciones en las proteínas HP1 y HP3, sintetizadas en condiciones restrictivas; el mutante sus A25 sintetiza en dichas condiciones una proteína de menor movilidad electroforética en geles de poliacrilamida que la proteína HP3 del fago normal; el mutante sus G10, en análogas condiciones, sintetiza una proteína de menor movilidad electroforética en geles de poliacrilamida que la proteína HP1 del fago normal y el mutante sus H1, en las mismas condiciones, es incapaz de sintetizar la proteína HP3, dando lugar a la aparición de un polipéptido que no es sintetizado por el

fago normal y que podría tratarse de un fragmento de la proteína HP3 (95). No obstante, las modificaciones en las proteínas HP1 o HP3 de estos mutantes aparentemente no afectan a la viabilidad de los mismos en condiciones restrictivas, puesto que las partículas de fago ensambladas en dichas condiciones resultan ser infectivas (95).

En la tabla XX se presenta la producción de fago que tiene lugar en la infección de B. subtilis 110NA su⁻ con cada uno de los mutantes, expresada en porcentaje respecto de la que tiene lugar en la infección con el fago normal en las mismas condiciones, comparándola con la producción de fago que tiene lugar en la infección con el mutante sus 12(610) llevado como control. El experimento se realizó como se describe en Métodos 17b. Como puede apreciarse, la producción de fago en las bacterias infectadas por los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1, supera a la que tiene lugar en el caso del fago normal, como sería de esperar de acuerdo con un fenotipo de lisis retrasada respecto del fago normal.

El mutante sus 7(614) es incapaz, en condiciones restrictivas, de inducir la síntesis de las proteínas p7 y HP3 sintetizándose un polipéptido cuya

Tabla XX. Producción relativa de fago en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con
mutantes sus de Ø29 a 42°C.

<u>Mutante</u>	<u>% de Fago Producido en su⁻</u>
sus ⁺	100
A25	315
G10	333
H1	350
12(610)	0.05

B. subtilis 110NA su⁻ creciendo en medio LB suplementado se infectó en fase logarítmica con Ø29 normal o con los diferentes mutantes sus que se indican, a multiplicidad 10. Los cultivos infectados se procesaron como se indica en complementación cuantitativa.

movilidad electroforética en geles de poliacrilamida el ligeramente superior a la de esta última proteína (39). Este mutante complementa con mutantes que no dan lugar a la síntesis de proteína HP3, lo que sugiere que la proteína HP3 sintetizada por el mutante sus 7(614) es dispensable. Si esto es así, revertientes del mutante sus 7(614) serían viables en condiciones restrictivas, pero podrían no ensamblar las fibras en la partícula de fago, si la proteína HP3 sintetizada en estas condiciones es incompleta. Con objeto de comprobar esta posibilidad, se aislaron varios revertientes del mutante sus 7(614), por plaqueo sobre B. subtilis 110NA su⁻, y se seleccionó uno de ellos, el revertiente IV, para su posterior estudio.

15) PROTEINAS INDUCIDAS EN LA INFECCION DE B. SUBTILIS 110NA SU⁻ CON LOS MUTANTES SUS A25, SUS G10, SUS H1, SUS 7(614) Y EL REVERTIENTE IV.

Para estudiar la síntesis de las proteínas inducidas por estos mutantes y por el fago normal, se infectó B. subtilis 110NA su⁻, irradiada con luz UV durante 7.5 minutos como se ha descrito (Métodos 10), y el marcó con leucina -C¹⁴ del minuto

25 al 33 después de la infección en el caso del fago normal, del mutante sus 7(614), del revertiente IV y de las células sin infectar llevadas como control y del minuto 30 al 38 después de la infección en el caso de los mutantes A25, G10, y H1, con objeto de hacer comparables los tiempos de marcaje teniendo en cuenta que estos tres últimos casos el desarrollo del fago está algo retrasado, en todos los casos se añadió un exceso de 100 veces leucina fría y si incubó durante dos minutos adicionales. Las alícuotas tomadas al cabo de este tiempo se lisaron y se disociaron las proteínas para someterlas a electroforesis en geles de poli-acrilamida en placa (Métodos 11b). La autorradiografía de la placa de electroforesis se realizó como se ha descrito en Métodos 12b.

La figura 64 muestra el desarrollo de fago que tiene lugar en la infección de B. subtilis 110 NA su⁻ irradiada con el fago normal, con los mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y sus 7(614) y con el revertiente IV aislado a partir de este último. Como puede apreciarse, a excepción del mutante sus 7(614), el desarrollo de fago tiene lugar en todos los demás casos.

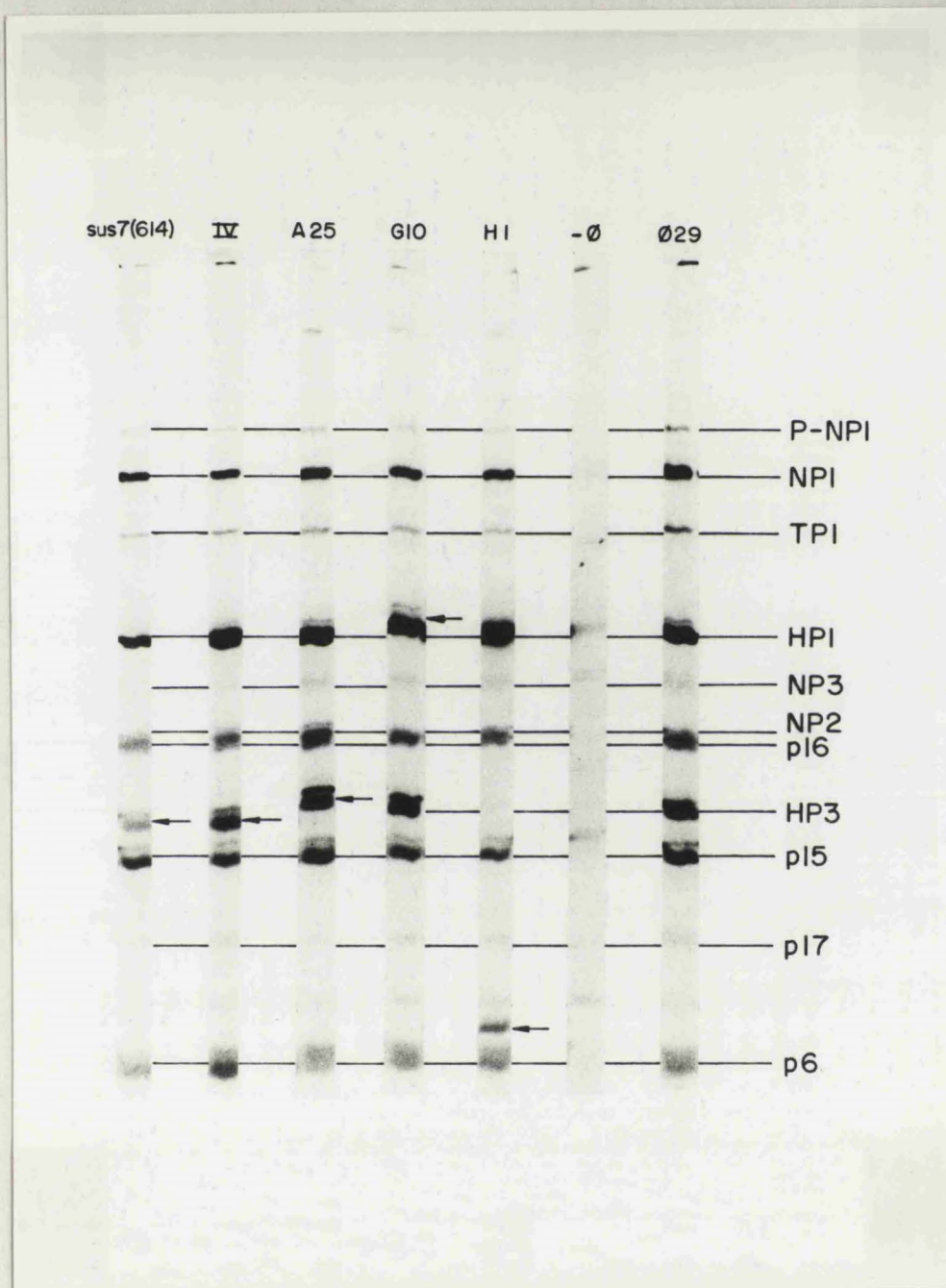


Figura 65. Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por los mutantes sus 7(614), sus A25, sus G10, sus H1 y el revertiente IV.

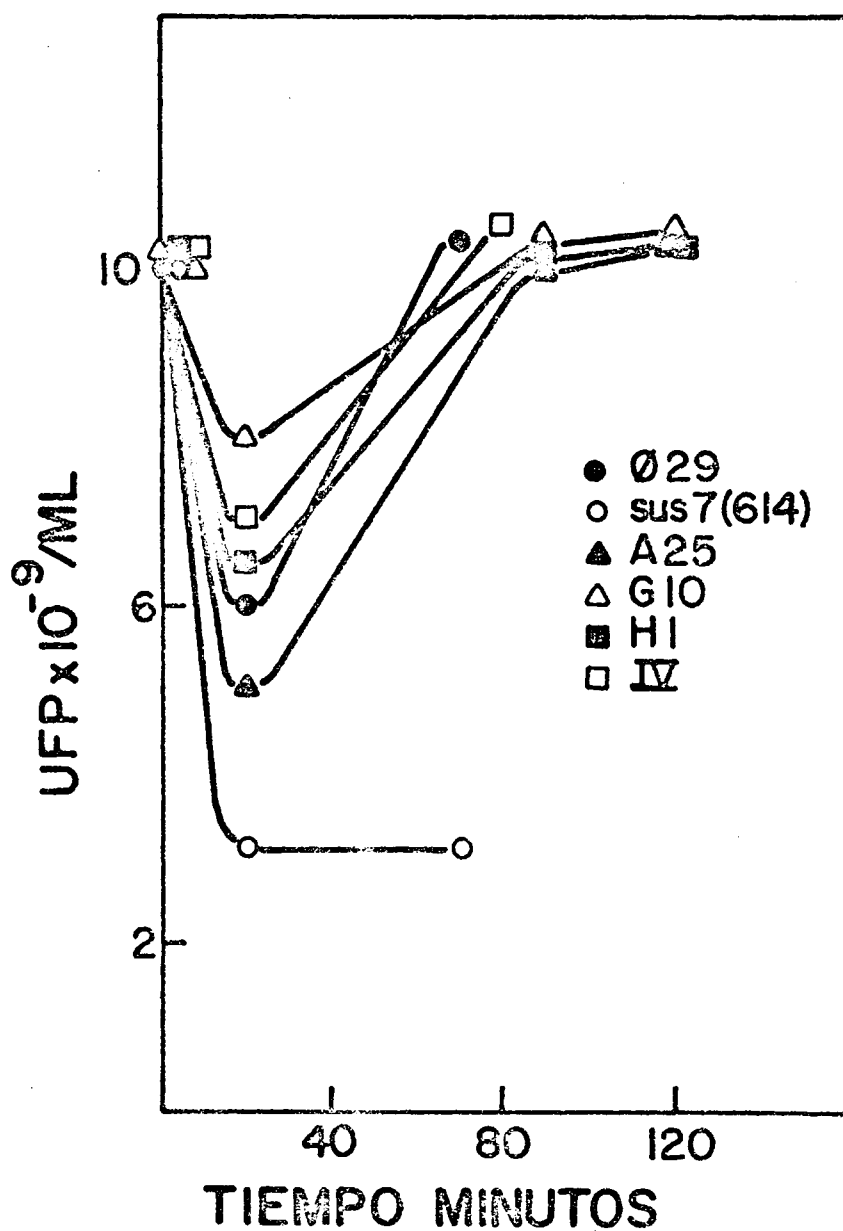


Figura 64. Desarrollo de fago en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con ø29 normal o con los mutantes sus 7(614), sus A25, sus G10, sus H1 o el revertiente IV.

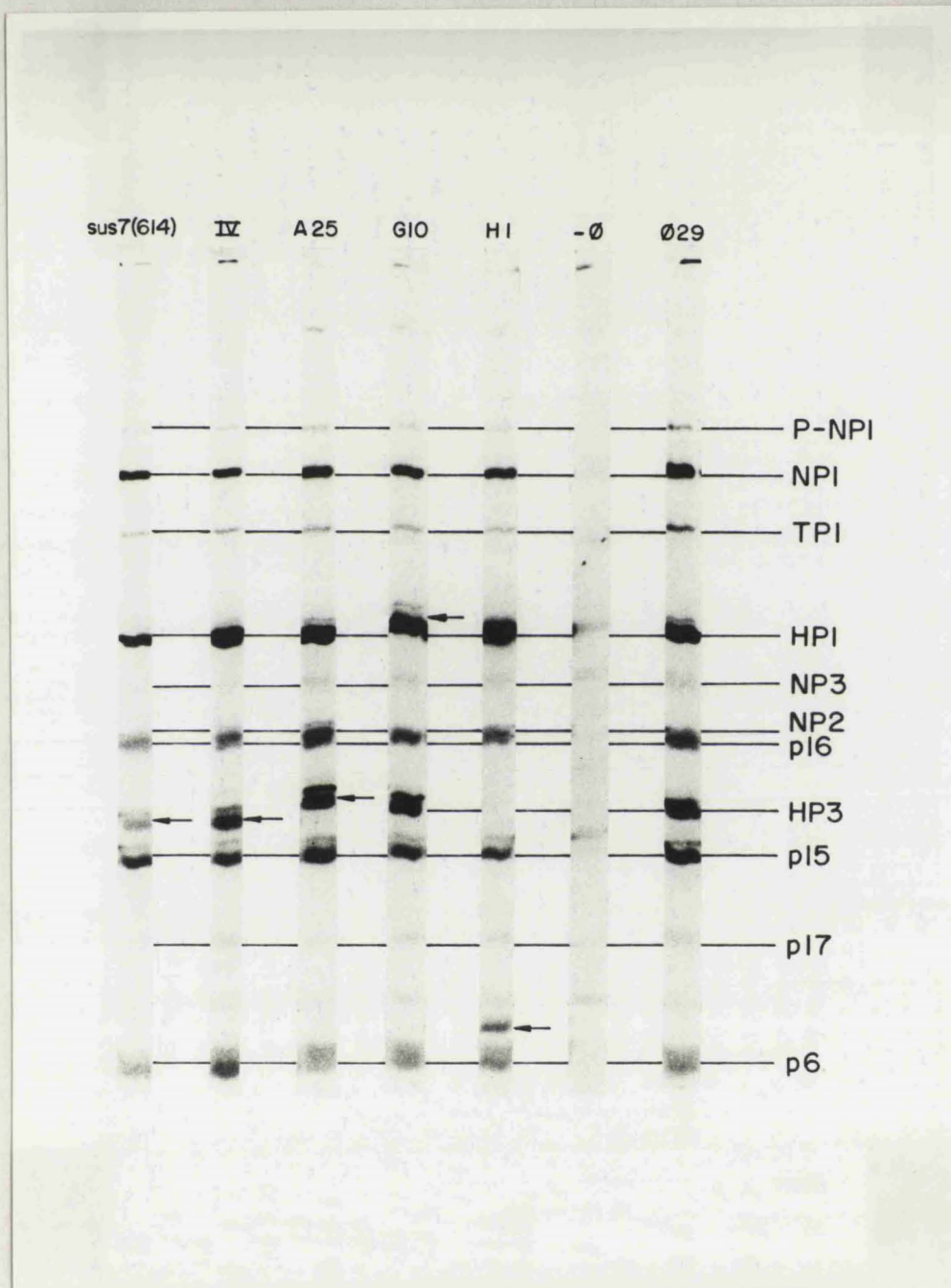


Figura 65. Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por los mutantes sus 7(614), sus A25, sus G10, sus H1 y el revertiente IV.

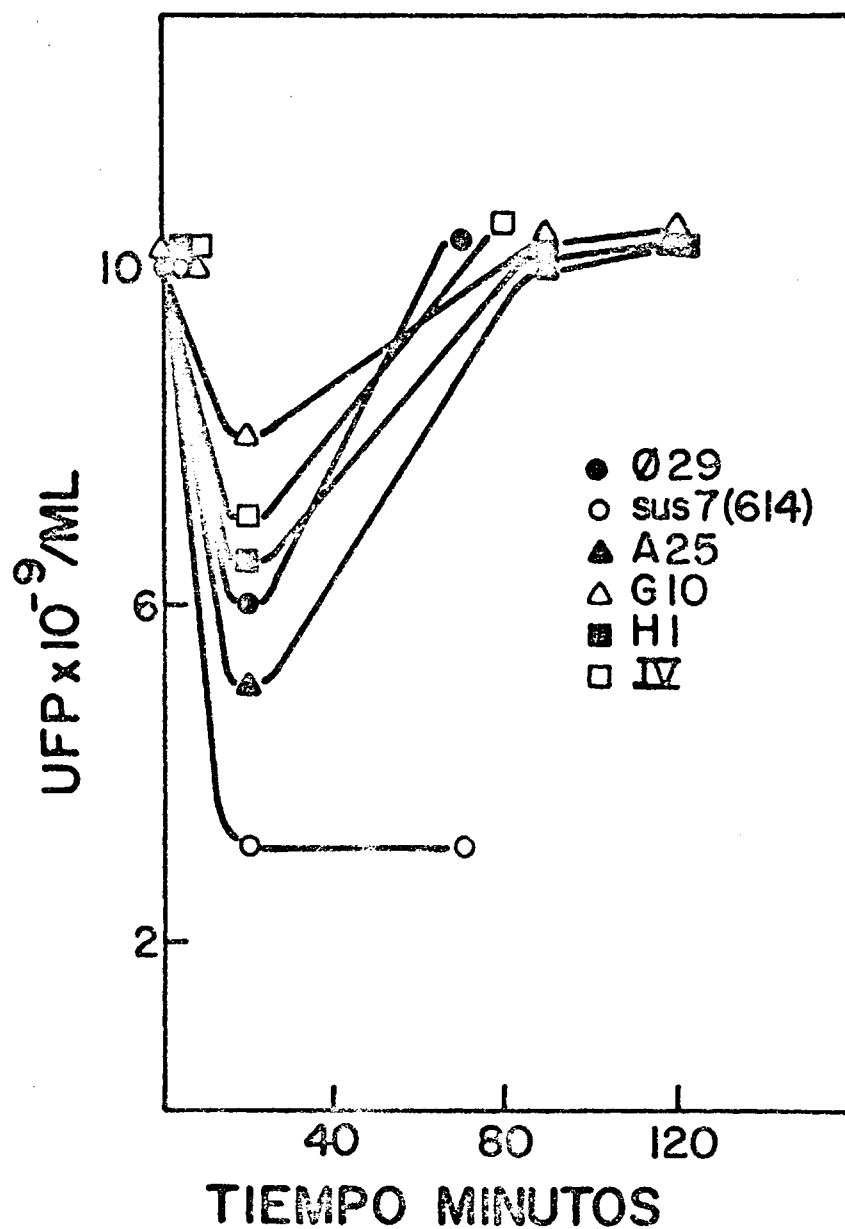


Figura 64. Desarrollo de fago en *B. subtilis* su⁻ irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 7(614), sus A25, sus G10, sus H1 o el revertiente IV.

La figura 65 muestra la autorradiografía de la placa de electroforesis de las proteínas presentes en las bacterias infectadas por el fago normal y por los mutantes arriba citados, así como de las proteínas presentes en las bacterias infectadas por el revertiente mencionado y en las bacterias sin infectar. Puede apreciarse que el mutante sus A25 presenta una proteína de menor movilidad que la proteína HP3 inducida por el fago normal, que el mutante sus 7(614) y el revertiente IV del mismo presentan una proteína de mayor movilidad que la proteína HP3 inducida por el fago normal, que el mutante sus G10 presenta una proteína de menor movilidad que la proteína HP1 inducida por el fago normal y que el mutante sus H1 es incapaz de sintetizar la proteína HP3 apareciendo un polipéptido de menor tamaño molecular que podría ser un fragmento de esta proteína. Los mutantes sus A25, sus H1, sus 7(614) y el revertiente IV de éste, presentan una proteína HP1 de movilidad igual a la sintetizada por el fago normal y el mutante sus G10 presenta una proteína HP3 de igual movilidad que la sintetizada por el fago normal.

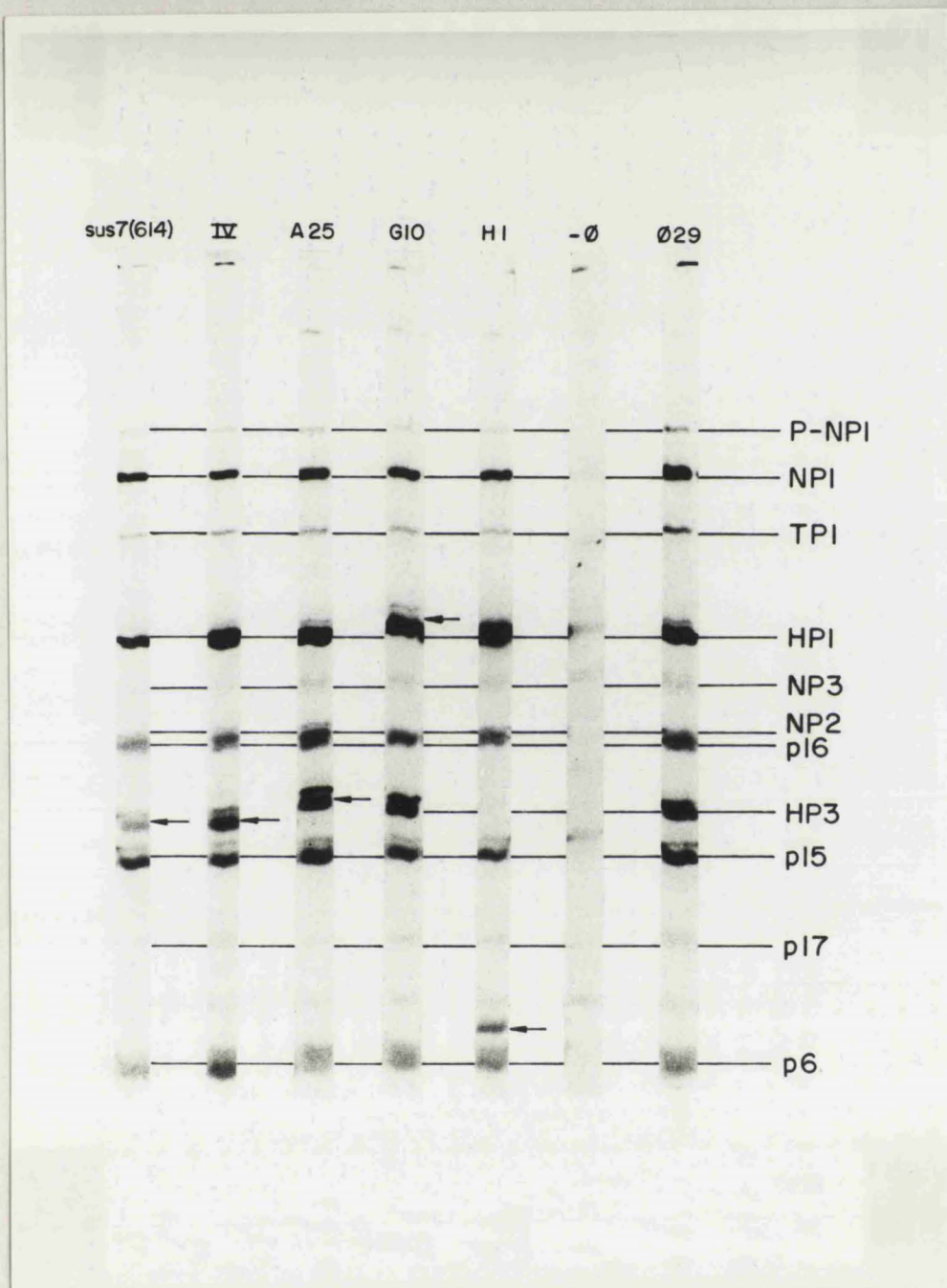


Figura 65. Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por los mutantes sus 7(614), sus A25, sus G10, sus H1 y el revertiente IV.

16) PARTICULAS DE FAGO PRODUCIDAS EN CONDICIONES
RESTRICTIVAS POR LOS MUTANTES SUS A25, SUS G10,
SUS H1 Y EL REVERTIENTE IV.

El hecho de que en condiciones restrictivas los mutantes A25, G10 y H1 se comporten fenotípicamente como si únicamente estuvieran afectados en la lisis de la bacteria, parece indicar que las otras mutaciones presentes en los genomas respectivos son dispensables, no afectando a la viabilidad de los mutantes en esas condiciones.

Con objeto de estudiar si las partículas de fago producidas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado por estos mutantes, así como por el revertiente IV del mutante sus 7(614), independientemente de que fueran infectivas, presentaban alguna modificación que las diferenciara de las partículas producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas condiciones, partículas que son idénticas a las del fago normal (92), se procedió a la preparación de las mismas, marcadas radioactivamente, como se ha descrito en Métodos 24.

En las figuras 66 a 70 se muestra el desarrollo de fago que tiene lugar en la infección con cada mutante, así como el que tiene lugar en la

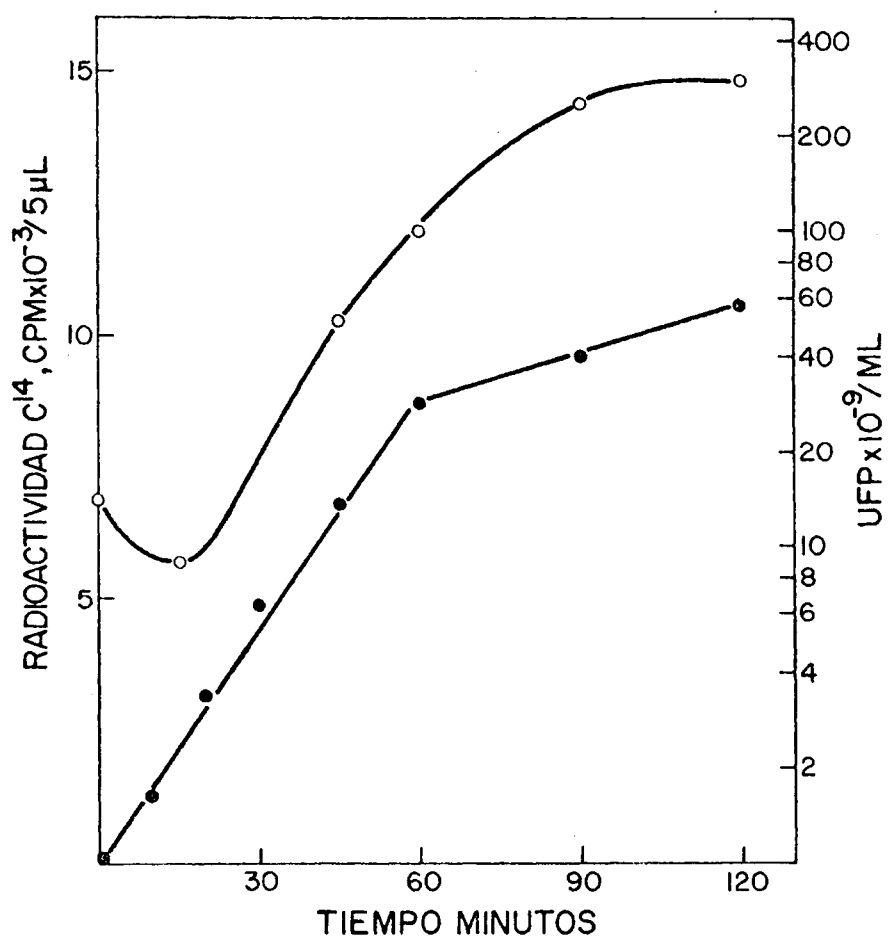


Figura 67. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis su⁻ infectado con el mutante sus A25.

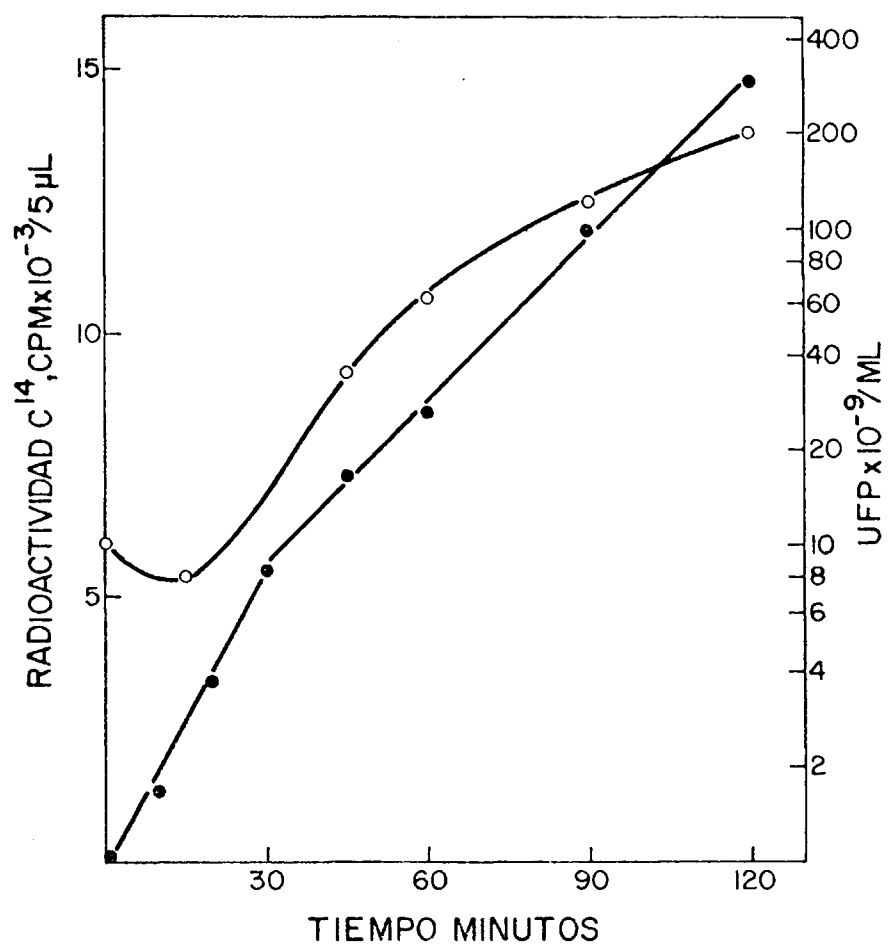


Figura 68. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus G10.

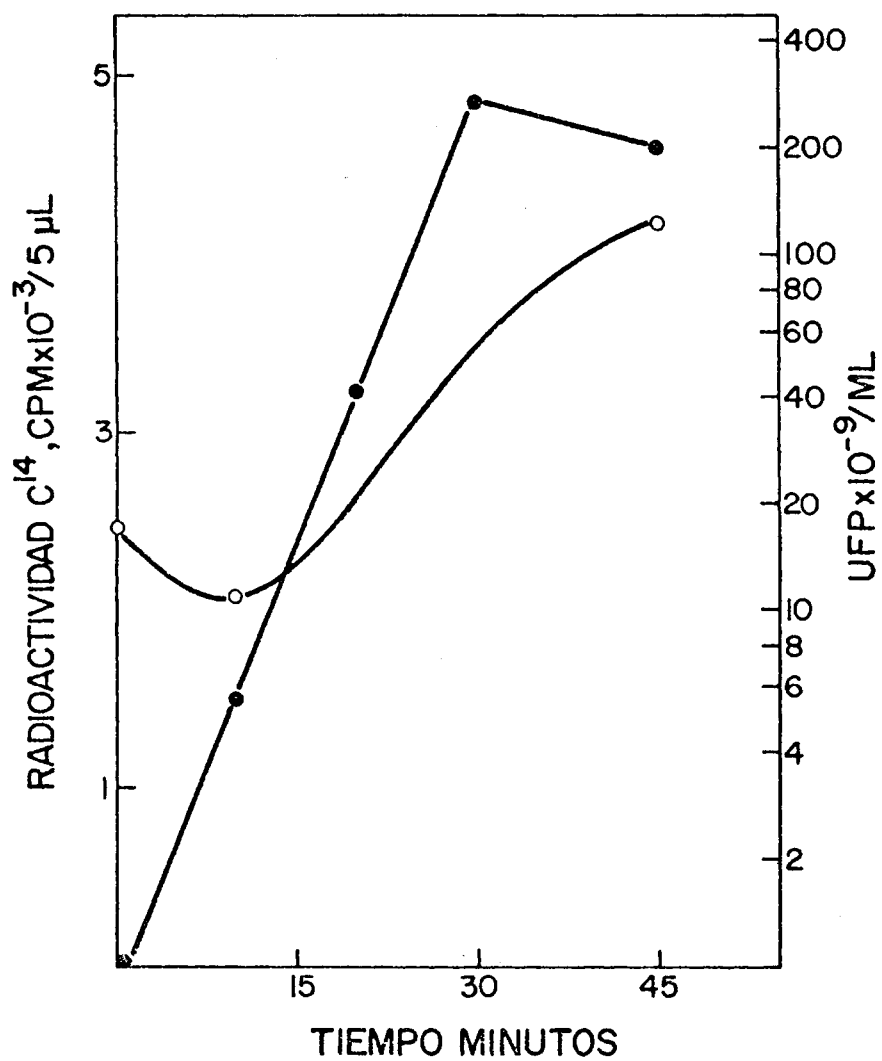


Figura 70. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis 110NA su^{-} infectado con el revertiente IV del mutante sus 7(614).

infección con el revertiente IV del mutante sus7 (614), junto con la incorporación de radioactividad a lo largo del tiempo. Puede observarse en todos los casos que hay desarrollo de fago; la incorporación de radioactividad, determinada como se indicó en Métodos 24, puede considerarse lineal a lo largo del tiempo.

Las figuras 71 a 75 muestran el resultado del fraccionamiento de los diferentes gradientes de ClCs por capas de densidades 1.1, 1.3 y 1.5 g/cm³, realizados para la purificación de las partículas producidas en cada caso, para separarlas de las cabezas de fago vacías, como se indicó en Métodos 24 y proceder a su estudio.

17) ANALISIS DE LAS PARTICULAS DE FAGO PRODUCIDAS EN CONDICIONES RESTRICTIVAS POR LOS MUTANTES SUS A25, SUS G10, SUS H1 Y EL REVERTIENTE IV.

a) Centrifugación en gradiente de ClCs.

Las figuras 76 a 79 muestran el resultado del fraccionamiento de los gradientes de ClCs centrifugados hasta equilibrio de densidad, como se describe en Métodos 25a, de las partículas de fago producidas por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y por el rever-

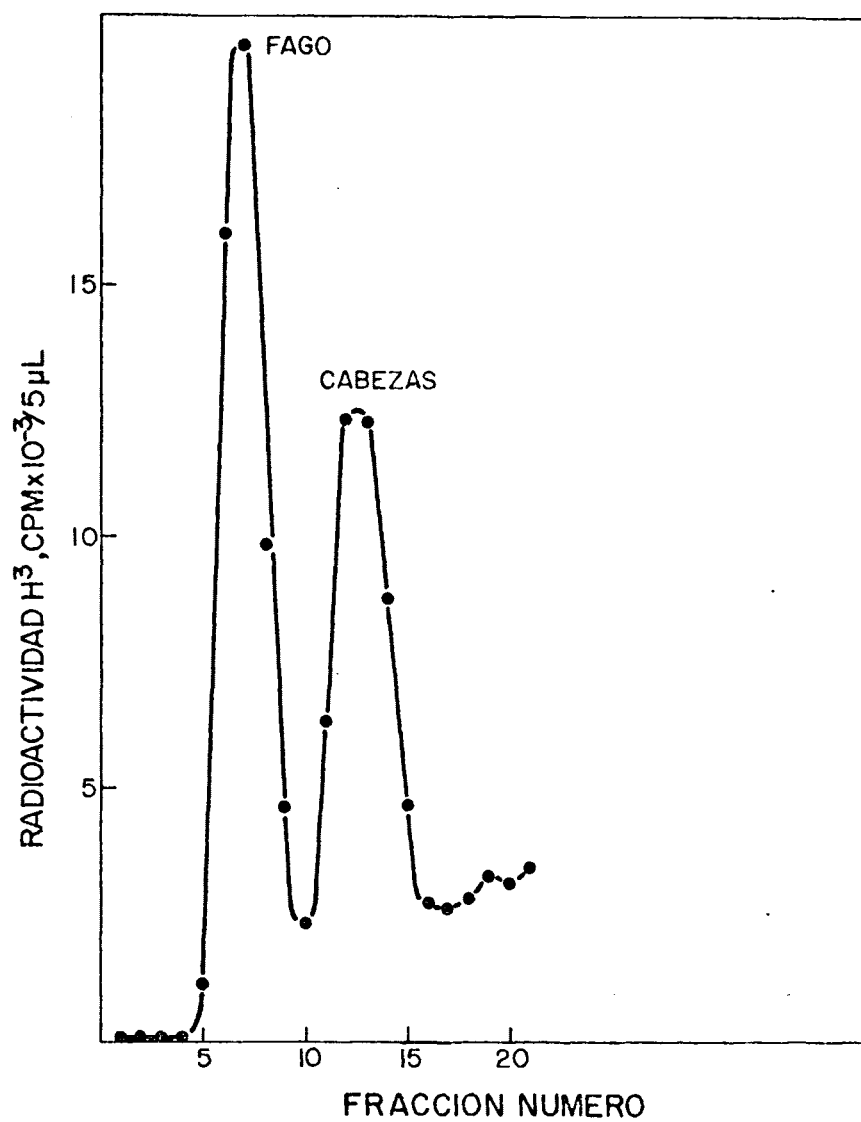


Figura 71. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus 14(1241).

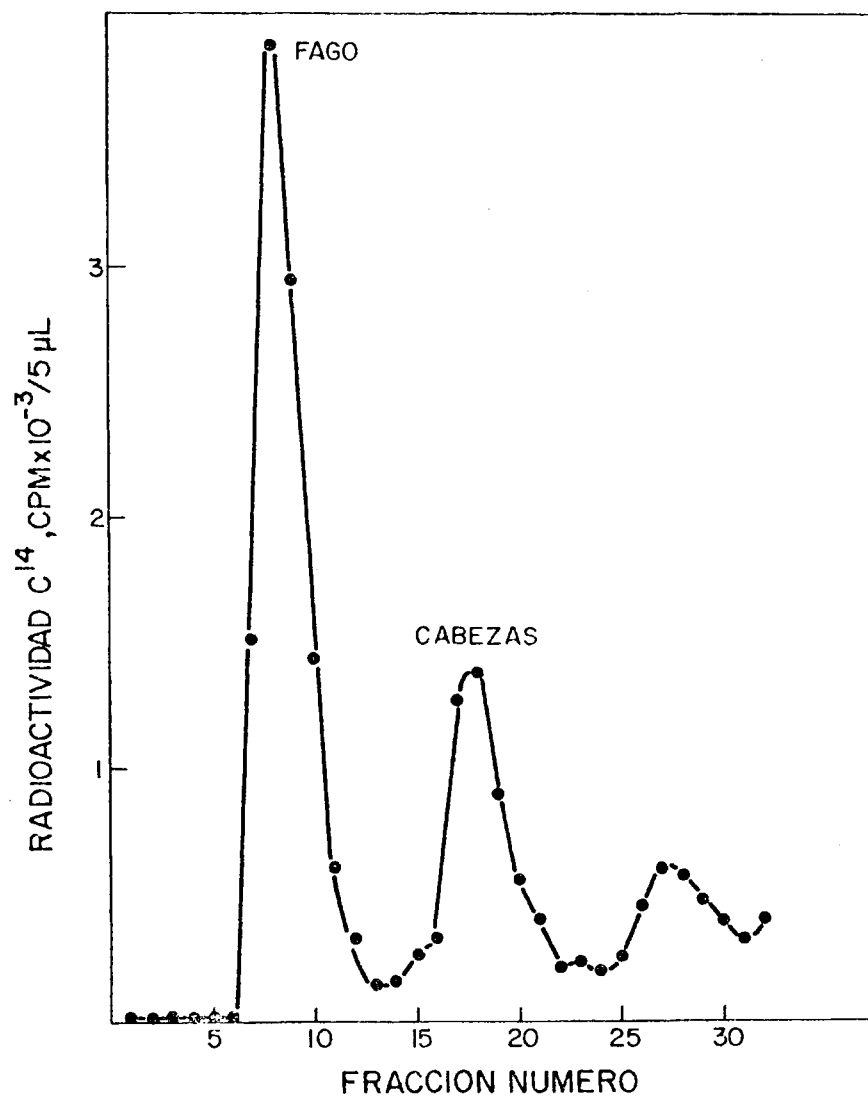


Figura 72. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en *B. subtilis* 110NA su⁻ infectado con el mutante sus A25.

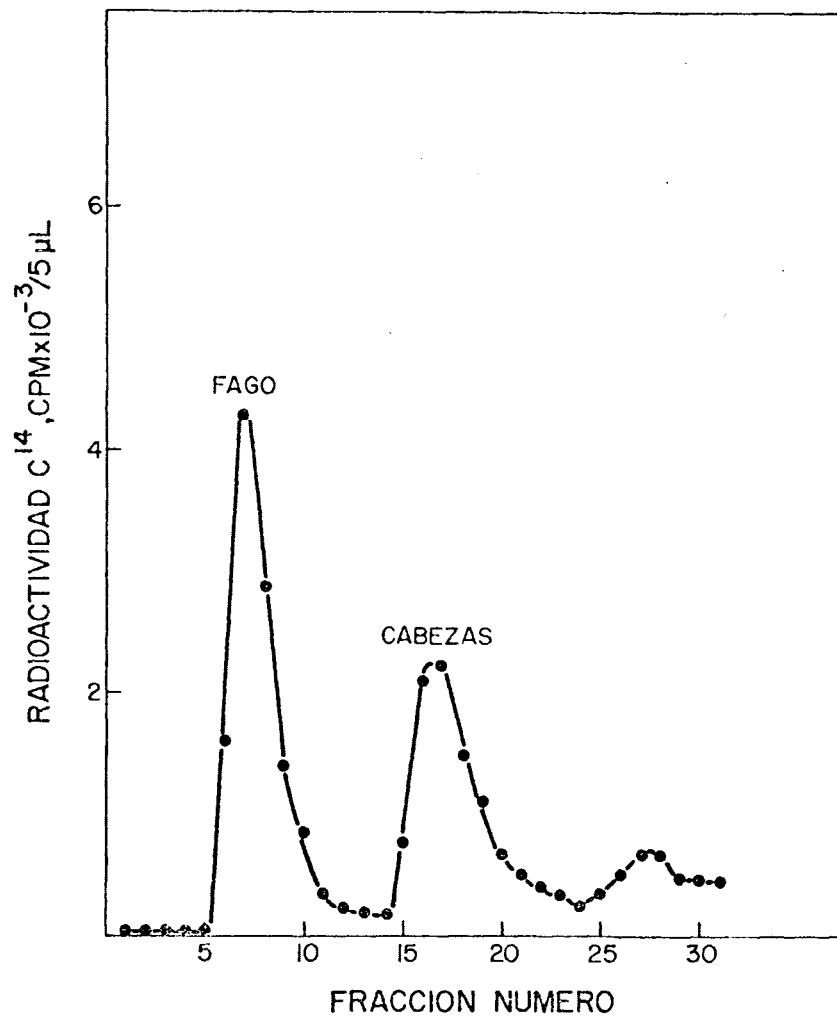


Figura 74. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus H1.

tiente IV del mutante sus 7(614) marcadas con C^{14} frente a las partículas de fago producidas por el mutante sus 14(1241) marcadas con H^3 , que se utilizan como marcadores de posición de las partículas de fago normales. Como puede apreciarse, las partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) tienen la misma densidad que las partículas de fago normales (Figura 76), a diferencia de lo que ocurre en los demás casos en los que las partículas de fago producidas presentan una densidad superior a la de las partículas de fago normales, pudiéndose estimar la diferencia de densidades en 0.03 g/cm^3 .

b) Centrifugación en gradiente de sacarosa

Las figuras 80 a 83 muestran el resultado del fraccionamiento de los gradientes de sacarosa del 5 al 20%, preparados como se describe en Métodos 25b, de las partículas de fago producidas por los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1 y por el revertiente IV del mutante sus 7(614), marcadas con C^{14} , frente a las partículas de fago producidas por el mutante sus 14(1241), marcadas con H^3 , llevadas como marcadores de posición de las partículas de fago normales. Como

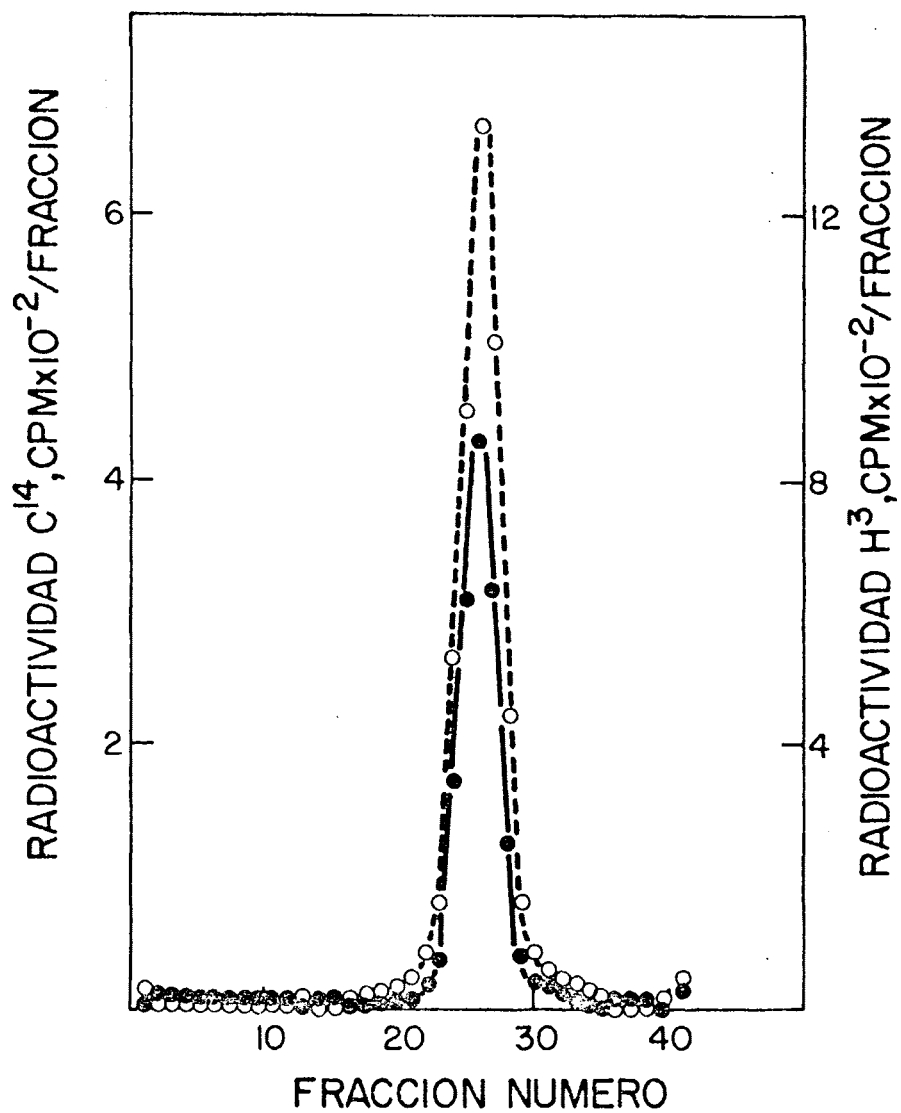


Figura 76. Análisis por centrifugación en ClCs hasta equilibrio de las partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

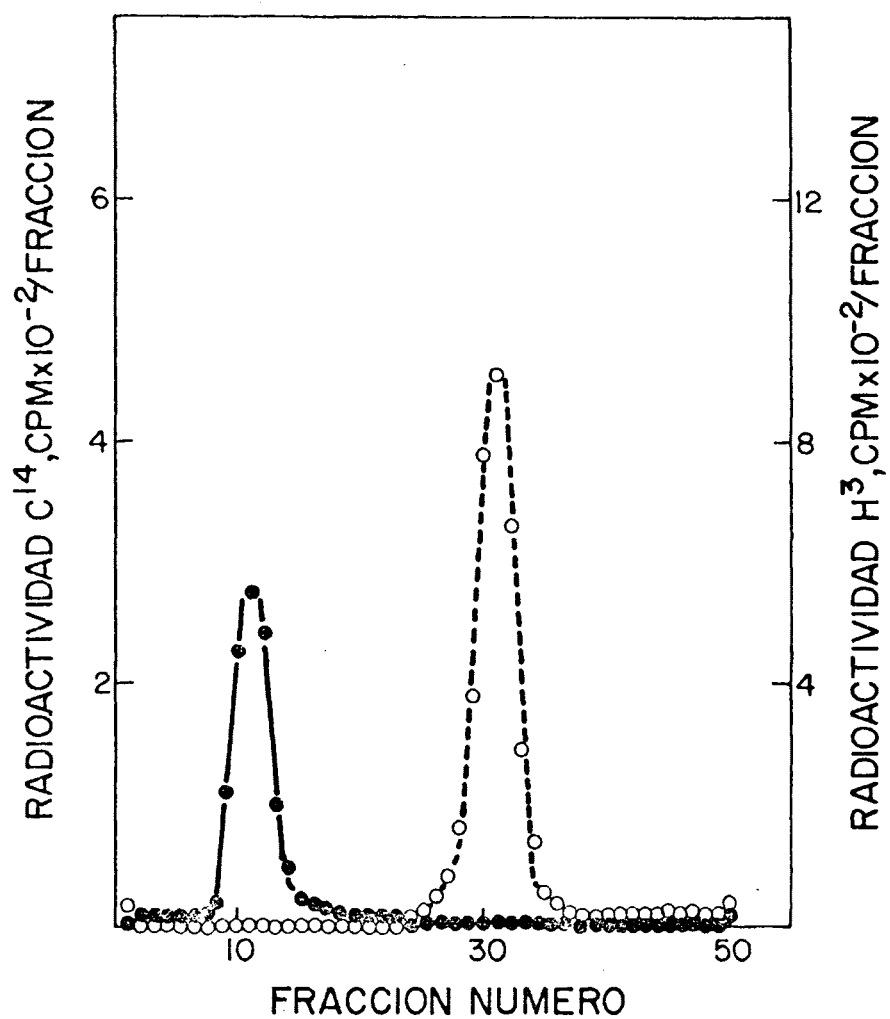


Figura 77. Análisis por centrifugación en ClCs hasta equilibrio de las partículas de fago producidas por el mutante sus A25 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

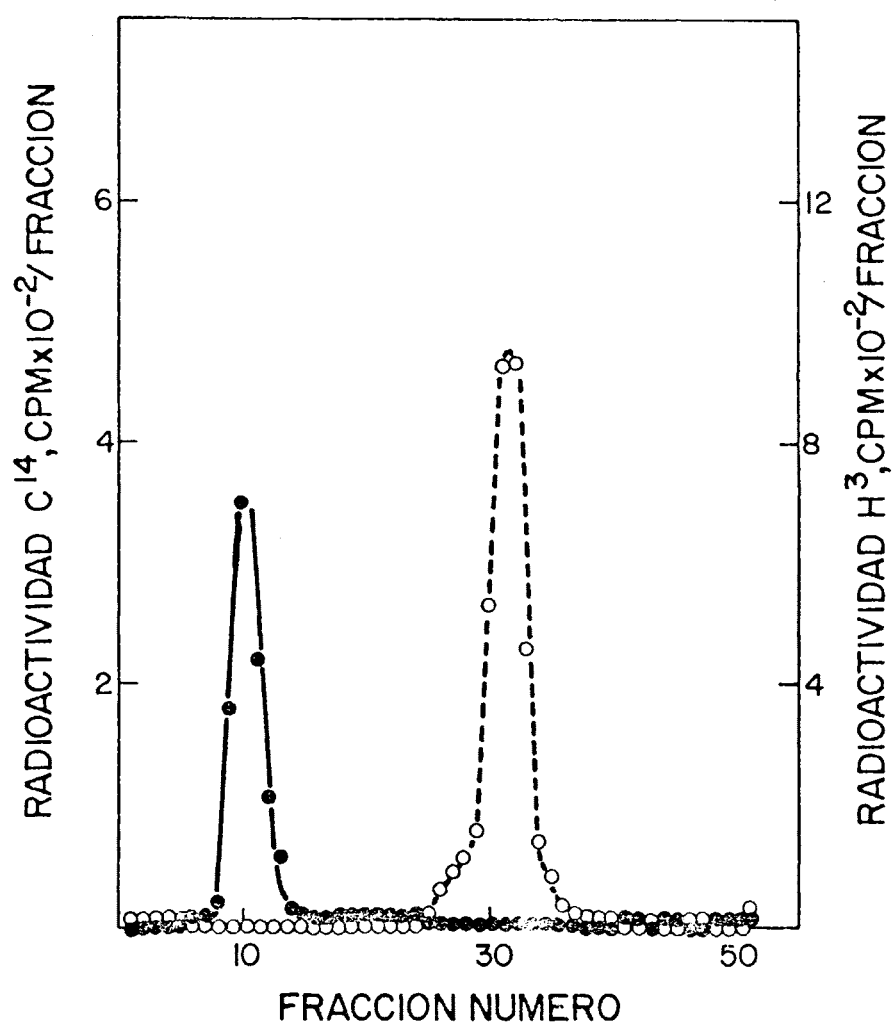


Figura 78. Análisis por centrifugación en ClCS hasta equilibrio de las partículas de fago producidas por el mutante sus G10 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

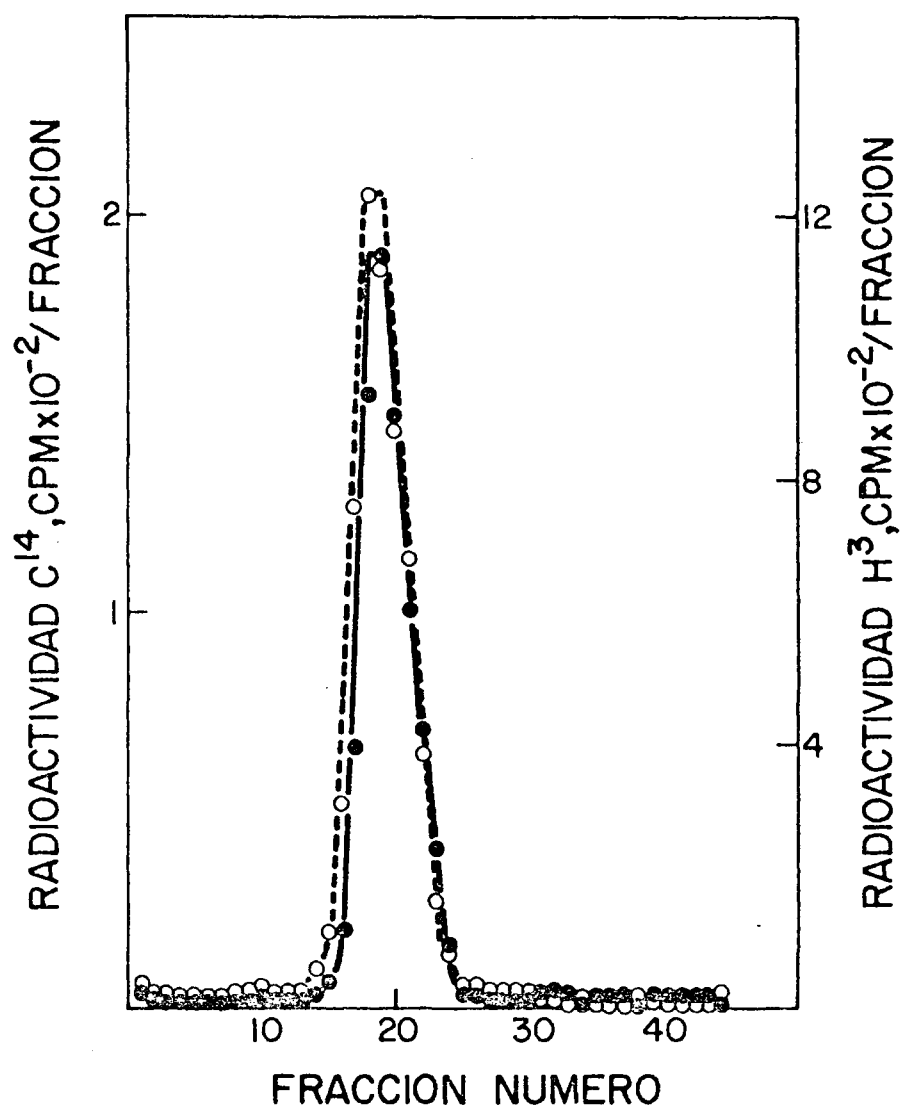


Figura 80. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

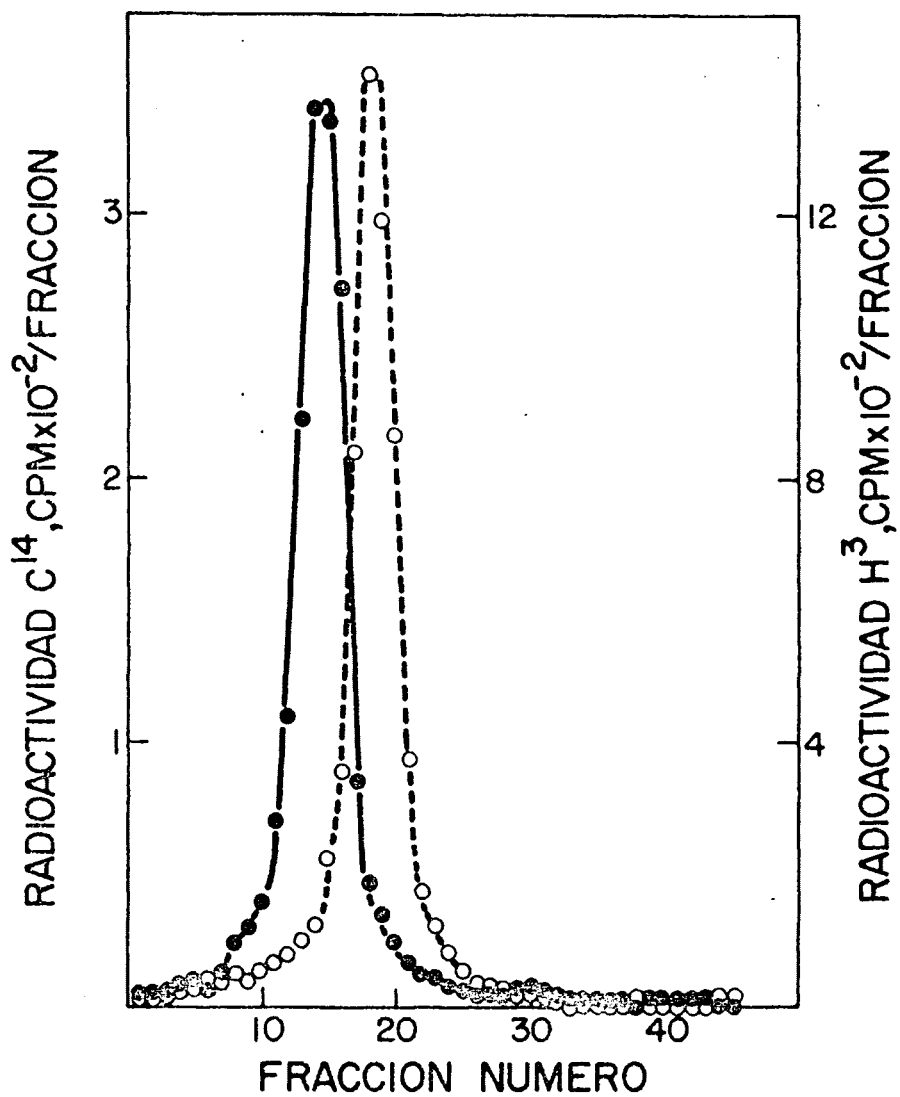


Figura 81. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el mutante sus A25 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

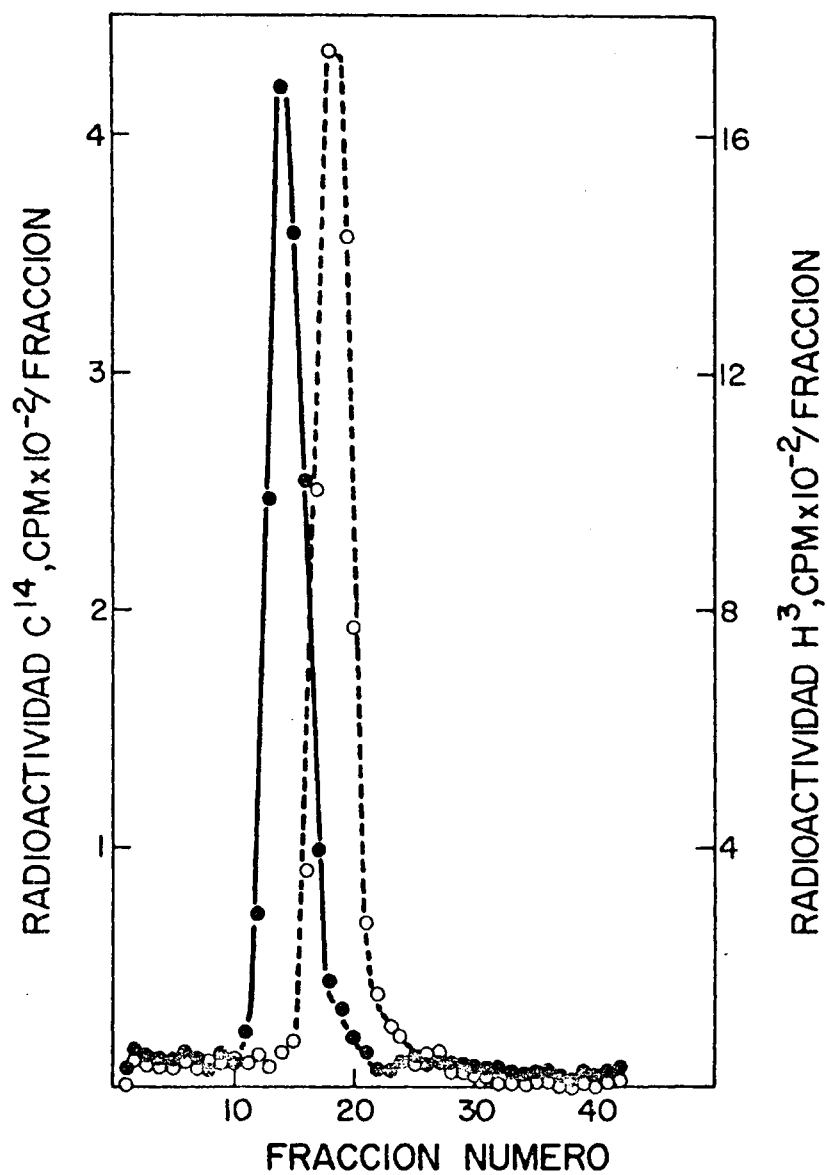


Figura 82. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el mutante sus G10 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

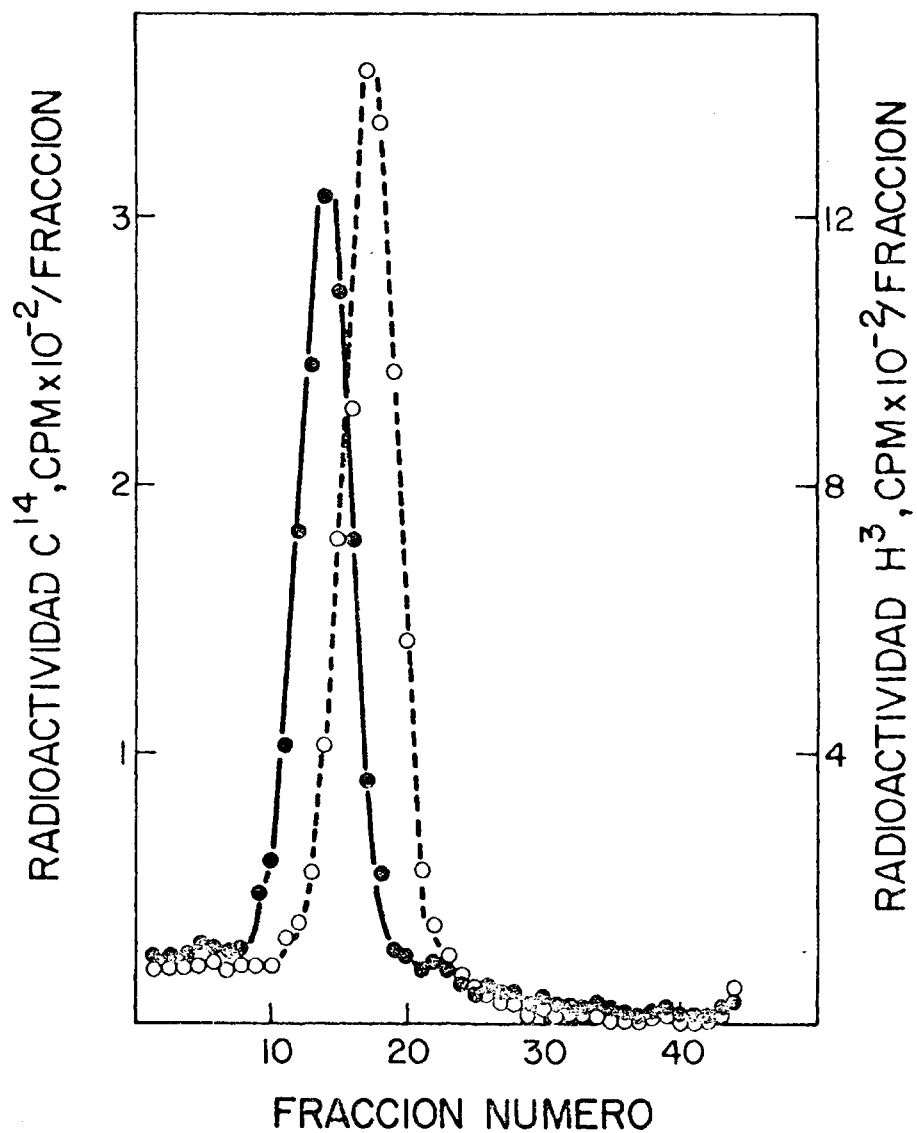


Figura 83. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el mutante *su*^{H1} en la infección de *B. subtilis* 110NA *su*⁻.

puede apreciarse las partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) sedimentan en la misma posición que las partículas de fago normales (Figura 80), a diferencia de las partículas de fago producidas por los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1, que presentan una velocidad de sedimentación mayor que las de las partículas de fago normales.

c) Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas presentes en las partículas de fago producidas por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y por el revertiente IV del mutante sus 7(614) se precipitaron en presencia de 30 µg de lisozima para favorecer su precipitación como se indica en Métodos 11b, y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en placa, como se indica en Métodos 12b.

La figura 84 muestra la autorradiografía de la placa de electroforesis de las proteínas presentes en las partículas de fago producidas por los mutantes y el revertiente citados, marcadas con C^{14} , utilizando como marcadores de posición las proteínas presentes en las partículas de fago normal marcadas con S^{35} , procesadas de igual manera y las proteínas inducidas en

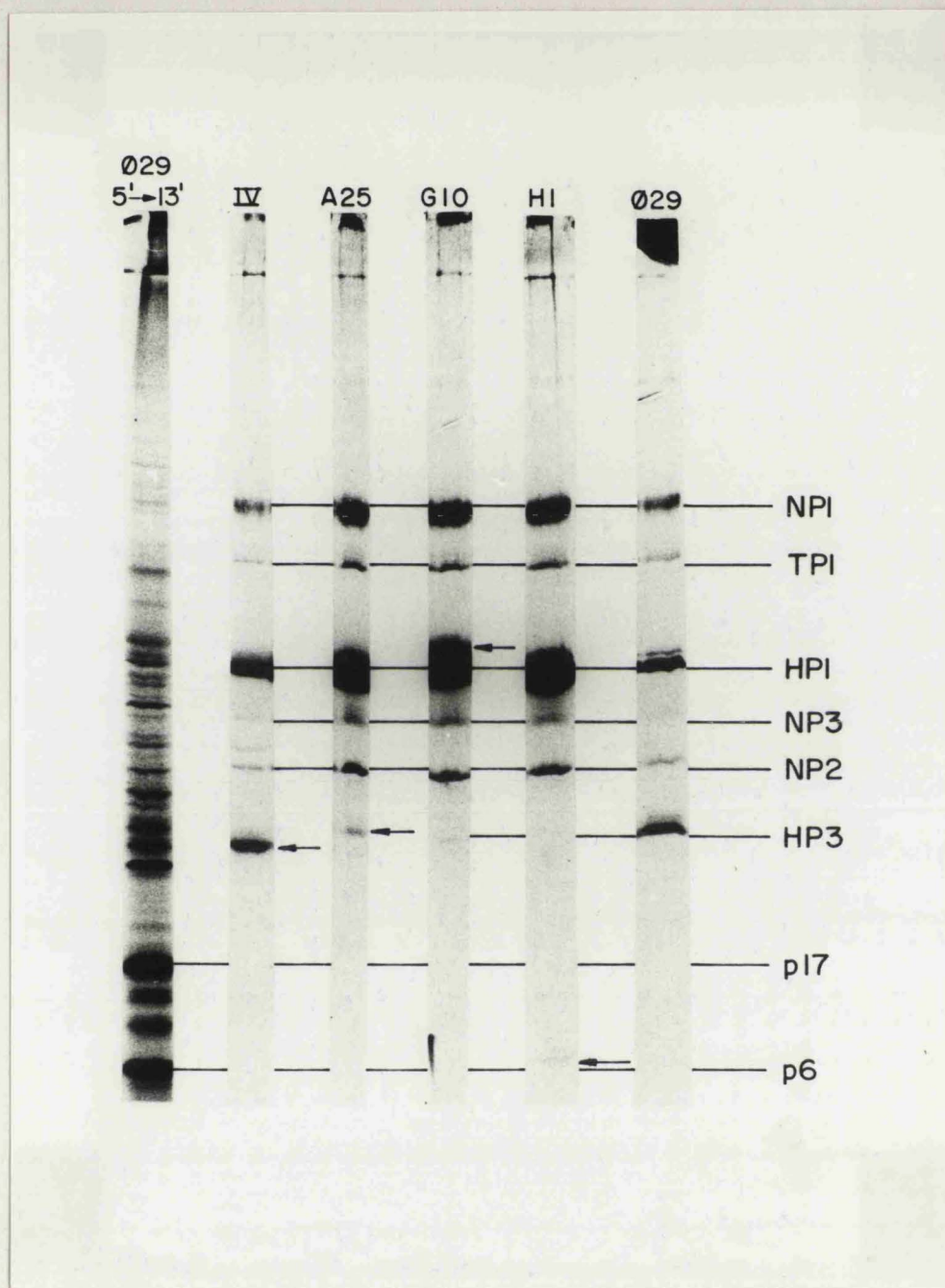


Figura 84. Autorradiografía de las proteínas presentes en las partículas de fago producidas en la infección de *B. subtilis* 110NA su⁻ por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y el revertiente IV del mutante sus 7(614).

la infección de B. subtilis 110NA su⁻ con el fago normal marcadas con leucina -C¹⁴ del minuto 5 al 13 después de la infección, disociadas como se indicó en Métodos 11b.

Como puede apreciarse, las partículas de fago producidas por el mutante sus A25 presentan una pequeña cantidad de una proteína de movilidad inferior a la proteína HP3 presente en las partículas de fago normal, siendo normal en su movilidad y cantidad la proteína HP1 presente en estas partículas. Las partículas de fago producidas por el mutante sus G10 presentan una proteína de menor movilidad que la proteína HP1 presente en las partículas de fago normal y una pequeña cantidad de proteína HP3 en la posición equivalente en movilidad a la proteína HP3 presente en las partículas de fago normal. Las partículas de fago producidas por el mutante sus H1 presentan una proteína HP1 de igual movilidad que la proteína HP1 presente en las partículas de fago normal, estando ausente la proteína HP3 y apareciendo una pequeña cantidad de un polipéptido cuya movilidad electroforética es ligeramente inferior a la de la proteína p6, y que podría tratarse de un fragmento de la proteína HP3. Las partículas de fago producidas por el rever-

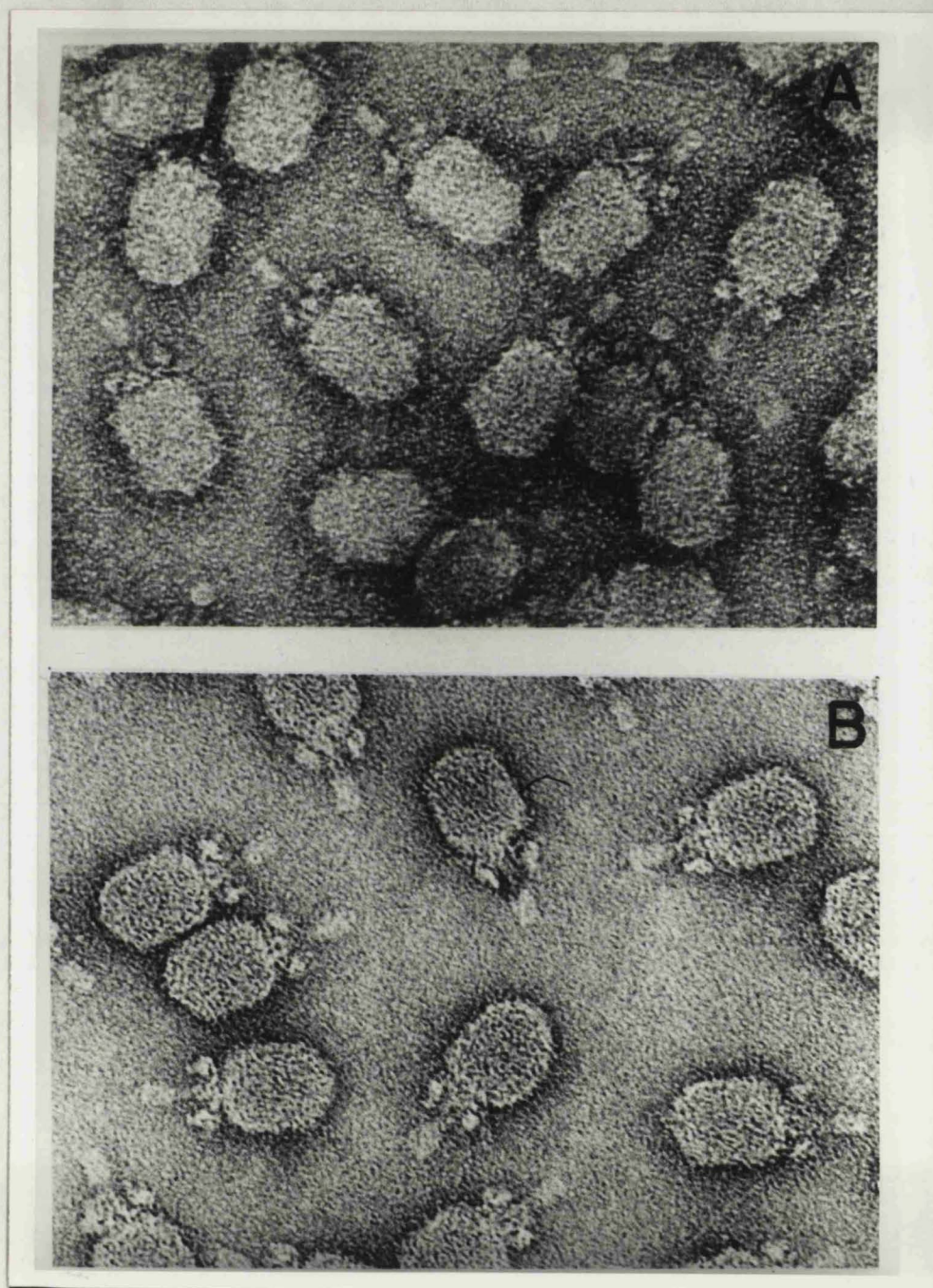


Figura 85. Microscopía electrónica de las partículas de fago producidas por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1, sus 14(1241) y el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

tiente IV del mutante sus 7(614) presentan una proteína HP1 normal y una proteína de mayor movilidad que la proteína HP3 presente en las partículas de fago normal, pero en cantidades normales.

d) Microscopía electrónica

La visualización al microscopio electrónico de las partículas producidas por los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1, demostró la ausencia de fibras en las mismas; éstas están presentes en las partículas producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) y por el mutante sus 14(1241). La figura 85 muestra la diferencia existente entre las partículas de fago que poseen fibras (figura 85A) y las partículas de fago que carecen de ellas (figura 85B), siendo estas últimas normales en todos los demás componentes.

DISCUSSION

Mediante experimentos de complementación cuantitativa, se han podido definir 17 cistrones en el genoma de Ø29, utilizando los mutantes sus y ts representantes de grupo de las colecciones de Moreno y col. (49), Talavera y col. (42), Reilly y col. (50) y Hagen y col. (43).

Once de los 17 cistrones identificados están representados por mutantes sus y ts, 5 cistrones se encuentran representados únicamente por mutantes sus y un sólo cistrón, el cistrón 5, está representado únicamente por mutantes ts.

El mutante sus I44 fue asignado por Moreno y col. (49) a un cistrón diferente del representado por los mutantes sus L53 y sus L55, debido a que la complementación del mutante sus I44 con los otros dos, producía unos valores ligeramente positivos, y en virtud de que la proteína XII (36) no era sintetizada en la bacteria supresora después de la infección con el mutante sus I44, mientras que su síntesis tenía lugar después de la infección con los mutantes sus L53 y sus L55. El mutante sus K330 perteneciente a la colección de Reilly y col. (50) da valores inferiores al 2% en la complementación con los

tres mutantes (Tabla IV). El mutante sus I342 fue asignado por Moreno y col. (49) al mismo cistrón que el mutante sus I44 debido a que el índice de complementación entre ambos mutantes era inferior al 0.5%. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que el mutante sus I342 puede inducir la síntesis de la proteína XII cuando infecta a la bacteria no supresora y que revertientes del mutante I44 siguen siendo incapaces de inducir la síntesis de la proteína XII en condiciones restrictivas. Estos datos sugieren que los mutantes en los cistrones I,L, (49) y K (50), pueden ser agrupados provisionalmente en un mismo cistrón, el cistrón 13.

Dos cistrones, 1 y 14, están representados por un sólo mutante, los mutantes sus 1(629) (50) y sus 14(1241) (49), respectivamente. El mutante sus 1(629) es incapaz de replicar su DNA en condiciones restrictivas y su complementación con los mutantes de idéntico fenotipo produce valores elevados, lo que determina que este mutante sea representante único del cistrón 1 sin ambigüedad.

El mutante sus 14(1241) presenta el fenotipo de lisis retrasada respecto al fago normal, alcanzando

en infecciones en condiciones restrictivas una producción de fago superior al 100% determinado por la producción de fago en la infección en idénticas condiciones con Ø29 normal. Este fenotipo único, junto con los datos de complementación cualitativa caracterizan a este mutante como único representante del cistrón 14.

El mutante sus 17(112) (49) da lugar a una producción de fago relativamente alta en condiciones restrictivas, pero no complementa con el mutante sus 17 (741) (50), cuya producción de fago en condiciones restrictivas es también ligeramente elevada. Ambos mutantes son incapaces de sintetizar DNA en condiciones restrictivas y su índice de recombinación no es superior a 0.1. Por otra parte, ambos mutantes son incapaces de inducir la síntesis de la misma proteína cuando infectan a una bacteria no supresora (39,99). Todos estos resultados son consistentes con la inclusión de ambos mutantes en el mismo cistrón.

Los mutantes ts 5(17) y ts 5(219) han sido incluidos en el mismo cistrón debido a que ambos son incapaces de sintetizar DNA en condiciones restrictivas, a que su complementación es negativa y a que su por-

centaje de recombinación es 0.05. Moreno y col.

(49) no pudieron localizar genéticamente al mutante ts 5(17), pero el Dr. B.E. Reilly, ha podido mapear el mutante ts 5(219) por cruces de tres factores (95) y las distancias genéticas de este mutante con los marcadores en los cistrones adyacentes se han podido determinar por cruces de dos factores. Estos resultados han permitido incluir en el mapa genético de Ø29, el cistrón 5.

Los datos de complementación y recombinación obtenidos utilizando mutantes sus y ts de Ø29 pertenecientes a las diferentes colecciones han permitido identificar 17 cistrones, confirmando la existencia de un único grupo de ligamiento lineal en el fago Ø29, de acuerdo con los resultados anteriormente obtenidos por Hagen y col. (43), Talavera y col. (100), Reilly y col. (50), McGuire y col. (38), y Moreno y col. (49).

El orden relativo de los 17 cistrones se ha determinado por cruces de dos y tres factores. La suma de distancias entre los marcadores adyacentes representantes de los diferentes grupos, da una longitud total de 24.4 unidades de recombinación (Figura

11). Este resultado está de acuerdo con el mapa genético de Talavera y col. (100), realizado utilizando mutantes ts de Ø29 y B. amyloliquefaciens como bacteria huésped, en que ordenó 10 cistrones con una extensión total de 20 unidades de recombinación y con el mapa genético de Moreno y col. (49) realizado utilizando mutantes sus y ts de Ø29, B. subtilis MO-99 su⁺₃ como estirpe supresora y B. subtilis 110NA su⁻ como estirpe no supresora, en el que quedaron ordenados 16 cistrones con una extensión total de 24,2 unidades de recombinación. El orden relativo de los 17 cistrones concuerda igualmente con el orden relativo establecido por Reilly y col. (50) por cruces de tres factores para los 10 cistrones que comprendía su mapa genético realizado con mutantes sus de Ø29 y utilizando B. subtilis 12A su⁻ y B. subtilis L15 su⁺₃ como estirpes no supresora y supresora, respectivamente.

Carrascosa y col. (39) han caracterizado los productos y las funciones de la mayoría de los genes de Ø29 utilizando los mutantes sus del fago. De acuerdo con sus resultados, es interesante destacar que los cistrones que determinan la síntesis de las proteínas estructurales (cistrones 8 a 12) se agrupan

en el centro del mapa genético análogamente a lo que sucede en el caso de otros bacteriofagos como lambda (101-103), T4 (104,105) y P22 (106) en los que se encuentran estos agrupamientos en el mapa genético de cistrones que determinan la síntesis de proteínas con funciones relacionadas. La proteína p7, especificada por el cistrón 7 juega un papel importante en la morfogénesis de la cápsida del fago (107); esta proteína es tardía como todas las proteínas estructurales y el cistrón 7 se encuentra junto a los cistrones que determinan la síntesis de las proteínas estructurales de Ø29.

Por otra parte, los mutantes en los cistrones 1, 2, 3, 5, 6, y 17, son incapaces de sintetizar DNA en condiciones restrictivas (39,83); todos estos cistrones, excepto el 17, se encuentran agrupados en el extremo izquierdo del mapa, tratándose de otro agrupamiento de genes que determinan la síntesis de proteínas con funciones relacionadas.

Schachtele y col. (108) han mostrado que el RNA tardío se transcribe de la banda H del DNA y que el RNA temprano se transcribe de la banda L del mismo, siendo la transcripción del DNA de Ø29 asimétrica, lo

que implica que la transcripción temprana y tardía del DNA de Ø29 llevan sentidos opuestos, ya que la transcripción del DNA se realiza desde el extremo 3'-OH al 5'-fosfato, y las dos cadenas del DNA son antiparalelas.

Del efecto polar de la mutación sus en el cistrón 10 sobre el cistrón 11, y del hecho de que el mutante sus 12(47) sintetice en condiciones restrictivas un fragmento de la proteína NP1 (NP1*) de peso molecular inferior al de la proteína NP1, así como de la posición de este mutante en el mapa genético, se puede concluir que la transcripción de los cistrones 7 a 12 tiene probablemente lugar de izquierda a derecha de la banda H del DNA.

Las proteínas especificadas por los cistrones 1, 3, 6, y 17 han sido caracterizadas como proteínas tempranas (39), las proteínas determinadas por los cistrones 2 y 5 están también implicadas en la síntesis del DNA y mutantes sus en el cistrón 4 (39) no pueden sintetizar ninguna proteína tardía en condiciones restrictivas, lo que sugiere que las proteínas especificadas por los cistrones 2, 4 y 5 son probablemente proteínas tempranas. Por tanto, los cistrones

1 al 6 y el cistrón se deben transcribir de derecha a izquierda de la banda L del DNA. Parece por consiguiente, que hay dos sitios probables para la iniciación de la transcripción temprana de la banda L, localizados a la derecha de los cistrones 6 y 17 respectivamente, a menos que el DNA se circularice y la transcripción temprana comience en un único sitio a la derecha del cistrón 6; si este fuera el caso, los cistrones implicados en la síntesis del DNA formarían un agrupamiento funcional completo al incluirse el cistrón 17 al lado del cistrón 1 en el DNA circularizado.

Los cistrones 15 y 16 determinan la síntesis de proteínas tardías (39). El cistrón 14 probablemente también especifica la síntesis de una proteína tardía, debido a que está implicado en el proceso de lisis de la bacteria. Si el cistrón 13 determinara una proteína tardía, toda la transcripción de los cistrones que determinan la síntesis de proteínas tardías, podría tener lugar de la banda H del DNA, comenzando a la izquierda del cistrón 7.

En 11 de los 15 cistrones para los que existían representantes de grupo común de las diferentes

colecciones, coinciden prácticamente los marcadores localizándose entre sí a distancias iguales o inferiores a 0.1 unidades de recombinación. En 10 de estos 11 cistrones, los marcadores eran mutantes sus pertenecientes a las colecciones de Moreno y col. (49) y Reilly y col. (50). Esta gran semejanza entre ambas colecciones de mutantes sus de Ø29 puede deberse al hecho de haber utilizado en ambos casos estirpes supresoras de B. subtilis que contenían el supresor su⁺³ aislado originalmente por Georgopoulos (45).

Carrascosa y col. (39) han demostrado que Ø29 es capaz de inducir un total de 22 proteínas cuando infecta a B. subtilis, aunque dos de estas proteínas, NP1 y p12 son el resultado de la transformación de un precursor de mayor peso molecular, P-NP1 (40,41), y por tanto, puede considerarse como 20 el número de proteínas inducidas por Ø29 que deben estar especificadas por el genoma del fago, lo que permite suponer la existencia de, al menos, otros tantos cistrones. Teniendo en cuenta que sólo se habían caracterizado un total de 17 cistrones nos propusimos tratar de obtener mutantes en otros cistrones.

La irradiación con luz ultravioleta de Ø29 sólo produjo mutantes sus localizados exclusivamente en el cistrón 11, hecho que puede explicarse debido a que la irradiación se realiza sobre fago completo, con el DNA empaquetado en el interior de la cápsida, lo que muy bien pudiera dejar accesible a la radiación tan sólo zonas o regiones muy específicas del DNA.

El hecho de la gran semejanza existente entre las colecciones de mutantes sus de Ø29 de Moreno y col. (49) y de Reilly y col. (50) por lo que se refiere a la proximidad en la localización de los mutantes representantes de grupo y el hecho de que ambas colecciones fueran aisladas utilizando estirpes supresoras que contenían el mismo supresor, su^{+3} , permite suponer que la obtención de mutantes sus de Ø29 en sólo 16 de los 20 cistrones posibles del genoma del fago, puede estar condicionada por la naturaleza de la estirpe supresora utilizada.

Camacho y col. (47) han caracterizado que la estirpe B. subtilis su^{+3} (45) es supresora de mutaciones sin sentido con una eficiencia de supresión de un 10%. Esta débil eficiencia de supresión puede ser

un problema para el aislamiento de mutantes sus en cistrones que determinan la síntesis de proteínas que se necesiten en cantidades estequiométricas durante el desarrollo del fago, mutantes que pueden no obtenerse utilizando esta estirpe supresora por no ser viables en ella. La necesidad, por tanto, de obtener un supresor de mayor eficiencia, es evidente para intentar aislar mutantes sus de Ø29 en los cistrones en que aún no se poseían mutantes.

Para la obtención de una estirpe supresora de elevada eficiencia, se partió de un mutante de B. subtilis, no supresor y poliauxotrófico, la estirpe MO-101-P spoA⁻ met⁻ thr⁻ su⁻ y se mutagenizó con EMS, que es capaz de inducir un 90% de supresores ambar en E. coli, como han mostrado Osborn y col. (76). La reversión para los requerimientos de una estirpe poliauxotrófica puede ser de dos tipos, reversión al tipo normal, o reversión por supresión de los requerimientos; de ahí la necesidad de efectuar una selección previa basada en la reversión de auxotrofia.

Las diferentes colecciones de mutantes sus de Ø29 han sido obtenidas con un supresor tan débil, que

por su eficiencia de supresión (10%), podría ser catalogado como supresor ocre (47). Teniendo en cuenta que un supresor ocre puede suprimir codones sin sentido ambar y ocre (55), una posibilidad era que la colección de mutantes sus obtenida por Moreno y col. (49) estuviera compuesta por mutantes sus ambar y ocre. Por otra parte, los supresores ambar son más eficientes que los ocre (51,61) y sólo pueden suprimir mutaciones ambar (55).

Por tanto la selección de un supresor de elevada eficiencia entre los revertientes para auxotrofia debía basarse en un ensayo, tan amplio como fuera posible, de la capacidad para suprimir alguno o algunos mutantes sus de Ø29, pero no a todos. El revertiente que cumpliera este requisito podría ser el supresor buscado. La estirpe B. subtilis MO-101-P spoA⁻ thr⁻ (met⁻)⁺ su⁺⁴⁴ se seleccionó de esta forma.

Hasta el presente, habían sido caracterizadas dos estirpes supresoras de B. subtilis, la estirpe su⁺³ de Georgopoulos (45) con una eficiencia de supresión del 10% (47) y la estirpe HA101B de Okubo y Yanagida (44) con una eficiencia del 27% (48). La estirpe B. subtilis su⁺⁴⁴, tiene una eficiencia de supresión

aproximadamente de un 50%, 5 y 2 veces más alta, respectivamente, que la de las otras dos estirpes supresoras.

Comparando la elevada eficiencia de supresión de la estirpe su^{+44} con la de estirpes supresoras de E. coli (55,61), la estirpe su^{+44} podría contener un supresor ambar o un supresor ópalo. Sin embargo, el hecho de haber sido seleccionada utilizando mutantes sus de Ø29 aislados en la estirpe su^{+3} , y el hecho de que uno de ellos, el mutante sus 12(47) no pueda ser suprimido por la estirpe su^{+44} , descartan la posibilidad de que esta estirpe pueda contener un supresor ópalo (54) y favorecen la hipótesis de que contenga un supresor ambar. En este caso, el mutante sus 12(47) llevaría una mutación ocre, lo que estaría de acuerdo con su baja eficiencia de supresión.

Si esto fuera cierto, se podrían aislar revertientes del mutante sus 12(47) que podrían ser suprimidos por ambas estirpes supresoras su^{+3} y su^{+44} . En efecto, se aislaron 26 revertientes que plaqueaban en ambas estirpes y que por complementación cualitativa mostraron pertenecer al cistrón 12. Uno de estos revertientes, el sus 12(610), escogido para su posterior

estudio, se recombinó con el mutante sus 12(47), siendo nula su frecuencia de recombinación, sugiriendo una localización idéntica en el mapa genético para los mutantes sus 12(47) y sus 12(610).

La eficiencia de supresión del mutante sus 12(610) por las estirpes su^{+44} y su^{+3} fue de un 57% y un 8%, respectivamente, valores similares a los obtenidos con el mutante sus 15(212) que es suprimido por ambas estirpes y en claro contraste con lo que sucede en el caso del mutante sus 12(47) que no es suprimido por la estirpe su^{+44} , siendo suprimido por la estirpe su^{+3} con una eficiencia del 12% (47).

Estos resultados son consistentes con la posibilidad de que la estirpe su^{+3} contenga un supresor ocre y de que la estirpe su^{+44} contenga un supresor ambar. El mutante sus 12(47) contendría una mutación ocre que podría revertir a una mutación ambar, contenida en el mutante sus 12(610), que sería suprimida por la estirpe supresora ambar (su^{+44}) y por la estirpe supresora ocre (su^{+3}).

De acuerdo con esta interpretación de los resultados, todos aquellos mutantes sus de Ø29 que se obtuvieran utilizando la estirpe su^{+44} , deberían ser

suprimidos también por la estirpe su^{+3} . No obstante, de la colección de 59 mutantes sus aislados en B. subtilis su^{+44} , 14 mutantes distribuidos en 6 de un total de 13 cistrones, no pueden desarrollarse en la estirpe su^{+3} . Una posibilidad que explicaría este resultado sería que el aminoácido insertado por la estirpe su^{+3} hiciera no funcionales a las diferentes proteínas. Para comprobar esta posibilidad, se analizaron las proteínas sintetizadas después de la infección de B. subtilis su^{+3} con los mutantes sus 8(22), sus 16(121) y sus 16(172). En los tres casos, se obtuvo supresión a nivel de proteína, con eficiencias de 10-20%, lo que indica que la imposibilidad de desarrollo de estos mutantes en la estirpe su^{+3} no se debe a que no sean suprimidos, sino a que probablemente el aminoácido insertado por el supresor hace a las proteínas no funcionales.

Todos los resultados son consistentes con la idea de que las estirpes su^{+44} y su^{+3} contienen un supresor ambar y un supresor ocre, respectivamente. No obstante, para determinar la naturaleza exacta de estos supresores, deben realizarse experimentos de síntesis de proteínas in vitro en un sistema libre de células, bien dirigido por el DNA de fagos de E.

coli que lleven mutaciones ambar y ocre conocidas y conteniendo el sistema tRNAs de las estirpes su^- , su^{+3} , o su^{+44} de B. subtilis, o bien dirigido por el DNA de mutantes sus de $\phi 29$ conteniendo el sistema tRNAs de estirpes supresoras ocre o ambar de E. coli.

Los mutantes sus en el cistrón 8, tanto los aislados utilizando la estirpe su^{+3} (50), como la estirpe su^{+44} , son incapaces de inducir la síntesis de las proteínas HP1 y HP3 cuando infectan a una estirpe no supresora de B. subtilis (39,40). La posibilidad de que la ausencia de ambas proteínas pueda deberse a una doble mutación es improbable, ya que se han analizado diferentes mutantes en este cistrón. Las otras dos posibilidades son: a) existencia de un efecto polar de la mutación sus en el cistrón 8, que especificaría la síntesis de una de las dos proteínas, sobre un nuevo cistrón, que determinaría a la otra proteína; b) el cistrón 8 determina la síntesis de una proteína precursora que es procesada posteriormente para dar lugar a ambas proteínas por un mecanismo similar al descrito en el caso del fago lambda (109) y en el del virus del polio (110).

La evidencia de la existencia de péptidos tripticos comunes entre las proteínas HP1 y HP3 (98) apoya

la segunda posibilidad, pero si es este el caso, se debería poder detectar la proteína precursora en experimentos de pulso y caza, y hasta el presente no hay ninguna prueba de su existencia, aunque la transformación del precursor en las proteínas producto, podría ser muy rápida y ocurrir a nivel ribosomal en el proceso de traducción, dificultándose así su detección.

Los mutantes sus en el cistrón obtenidos por mutagénesis in vitro permitiendo la libre actuación del agente mutagénico sobre el DNA lineal de ϕ 29 o sobre el fragmento EcoRI-A, que abarca la mitad izquierda del genoma del fago, y utilizando un método de selección por rescate de marcadores que permite obtener sólo aquellos mutantes que se hayan rescatado por sobrecruzamientos producidos a la derecha del marcador ts8(93), se localizaron en las proximidades del mutante sus 8(769) y fueron incapaces de sintetizar las proteínas HP1 y HP3 en condiciones restrictivas como sería de esperar de acuerdo con su localización genética.

De los resultados obtenidos con los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1 se puede deducir que basta con que exista una pequeña cantidad de la proteína HP3 ensamblada (caso del mutante sus G10) para que las partículas de fago producidas sean viables. Incluso basta que exista ensamblada, en lugar de la proteína HP3, una pequeña cantidad de la proteína de mayor movilidad presente en las partículas de fago producidas por el mutante sus A25, o una pequeña cantidad del presunto fragmento de la proteína HP3, (caso del mutante sus H1) para que las partículas de fago producidas sean igualmente viables. Las partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en condiciones restrictivas son normales; la única diferencia apreciable respecto a las partículas de fago normales es la existencia, en lugar de la proteína HP3, de un polipéptido de movilidad electroforética ligeramente superior; éste podría ser un fragmento de la proteína HP3, debido a la presencia de una mutación sin sentido en el extremo carboxilo terminal de la molécula de proteína, que no afectaría en absoluto a la funcionalidad de la misma y siendo por ello normales, en todos los aspectos estudiados, las partículas de fago producidas por el revertiente

IV. Estos resultados parecen indicar que la proteína HP3 es en cierta manera dispensable, o que al menos es necesaria en muy pequeña cantidad, no precisándose para la viabilidad de la partícula de fago producida, que la molécula de proteína HP3 ensamblada esté completa.

Si esto es así, en el procedimiento de selección empleado para la obtención de mutantes sus en el cistrón 8 por mutagénesis in vitro, los posibles mutantes afectados exclusivamente en la proteína HP3 podrían no haber sido seleccionados dada la posible dispensabilidad de la proteína.

De estos resultados y de los obtenidos con los mutantes sus en el cistrón 8, no puede determinarse si las proteínas HP1 y HP3 son sintetizadas en forma de proteína precursora o si la mutación sus en el cistrón 8 que determina la síntesis de una de ellas, ejerce un efecto polar sobre el presunto cistrón que determina la síntesis de la otra proteína. Pero el hecho de que el mutante sus H1, que es incapaz de sintetizar la proteína HP3 en condiciones restrictivas, pueda sintetizar en las mismas condiciones la proteína HP1 completamente normal, permite suponer que la región

del genoma que determina la síntesis de la proteína HP3 está situada a la derecha de la correspondiente a la proteína HP1.

El análisis de la composición de aminoácidos de los péptidos tripticos comunes de las proteínas HP1 y HP3 para comprobar la posible identidad de los mismos, así como la localización genética de la mutación que afecta a la proteína HP3 presente en el genoma del mutante sus H1, y la obtención de nuevos mutantes en el cistrón o cistrones que determinan la síntesis de las proteínas HP1 y HP3, mediante la utilización de agentes mutagénicos diferentes, son proyectos que se están llevando a cabo nuestro laboratorio.

CONCLUSIONES

1. Mediante experimentos de complementación y estudios de síntesis de DNA en condiciones restrictivas, utilizando mutantes *sus* y *ts*, se han podido definir un total de 17 cistrones en el genoma de $\phi 29$.
2. Mediante experimentos de recombinación inter e intracistrónica, comprendiendo cruces de dos y tres factores se ha podido determinar el orden relativo de los 17 cistrones y construir un mapa genético confirmando la existencia en $\phi 29$ de un único grupo de ligamiento no circular.
3. La longitud del mapa genético de $\phi 29$, obtenida sumando la distancia entre marcadores inmediatos es de 24.4 unidades de recombinación.
4. Por tratamiento de *B. subtilis* MO-101-P *spoA*⁻ *met*⁻ *thr*⁻ *su*⁻ con etilmetano sulfonato, se ha obtenido la estirpe supresora *B. subtilis* MO-101-P *spoA*⁻ (*met*⁻)⁺ *thr*⁻ *su*⁺⁴⁴.

5. Los estudios realizados con las proteínas inducidas en la infección de B. subtilis su^{+44} y su^{+3} con diversos mutantes sus de Ø29 han permitido estimar una eficiencia de supresión para la estirpe su^{+44} de alrededor del 50% y confirmar una eficiencia de supresión alrededor del 10% para la estirpe su^{+3} .
6. La utilización de B. subtilis su^{+44} como estirpe supresora ha permitido obtener una colección de 59 nuevos mutantes sus de Ø29.
7. Los experimentos de complementación realizados con la nueva colección de mutantes sus de Ø29, han permitido agrupar los 59 mutantes en 13 cistrones, mostrando la existencia de representantes sus en 3 cistrones que no estaban representados en la colección anteriormente aislada en nuestro laboratorio utilizando B. subtilis su^{+3} como estirpe supresora.
8. Los estudios realizados sobre las proteínas inducidas en la infección de las estirpes su^{-} , su^{+3}

y su^{+44} con diversos mutantes su , pertenecientes tanto a las colecciones existentes como a la obtenida utilizando la estirpe su^{+44} , sugieren fuertemente que la estirpe su^{+3} contiene un supresor ocre y que la estirpe su^{+44} contiene un supresor ambar.

9. Los estudios realizados con los mutantes su de $\phi 29$ en el cistrón 8, así como los estudios realizados con los mutantes su de $\phi 29$ afectados en el ensamblaje de las fibras durante la morfogénesis viral, han permitido determinar que la región del genoma del fago que especifica la síntesis de la proteína HP3 se localiza a la derecha de la que especifica la proteína HP1, determinándose también la parcial dispensabilidad de la proteína HP3 para la viabilidad del fago.

LEYENDAS A LAS FIGURAS

Figura 1. Inactivación de Ø29 normal por irradiación con luz UV.

Un volumen de 5 ml de una suspensión de Ø29 normal en DF a una concentración de 1×10^{12} ufp/ml en una placa Petri de 10 cm de diámetro, se irradió con una lámpara germicida a una intensidad de 80 μ A. Las alícuotas tomadas a los tiempos de irradiación que se indican se plaquearon sobre B. subtilis MO-99 su⁺³, como se indica en Métodos 4, para determinar el fago que permanecía activo.

Figura 2. Disminución de la viabilidad de B. subtilis MO-101-P su⁻ por tratamiento con EMS.

Un cultivo de B. subtilis MO-101-P su⁻ a una concentración de 4×10^7 células/ml se incubó en presencia de EMS al 4% (v/v). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 2 ml que se filtraron y lavaron como se indica en Métodos 8. Los filtros se dejaron resuspender en medio LB suplementado con SO₄Mg 5mM. La viabilidad de las células se determinó extendiendo con un asa de vidrio 0.1 ml de una dilución apropiada de la resuspensión sobre una placa Petri que contenía medio LB y agar sólido. Un cultivo de bacterias en ausencia de EMS, llevado como control, se incubó y procesó en idénticas condiciones.

(—●—) células en ausencia de EMS;
 (—○—) células en presencia de EMS.

Figura 3. Obtención de B. subtilis en fase competente.

B. subtilis Mu8u5ul se creció en medio definido de competencia como se indica en Métodos 21. Se tomó T_0 como el punto en que la densidad óptica del cultivo se desvió de la línea de crecimiento logarítmico.

Figura 4. Inactivación del DNA lineal de Ø29 por tratamiento con ácido nitroso.

Una solución de 100 µg/ml del DNA lineal de Ø29 en acetato sódico 0.5 M tamponado con ClH a pH 4.2 en presencia de nitrito sódico 0.1 M, se incubó a 37°C con agitación suave. Las alícuotas tomadas a los tiempos que se indican se procesaron como se describe en Métodos 22a. La actividad del DNA de Ø29 tratado se ensayó por rescate de marcadores como se indica en Métodos 23a.

Figura 5. Inactivación del DNA lineal de Ø29 por tratamiento con hidroxilamina.

A una solución de DNA lineal de Ø29, 100 µg/ml, se añadió hidrocloruro de hidroxilamina 1 M y ClNa 5 M y NaOH 10 M de modo que la concentración

final de Na^+ fuera 3 M y el pH quedara fijado en 6.2. La solución se incubó a 75°C. Las alícuotas tomadas a los tiempos que se indican se procesaron y la actividad del DNA se ensayó como se indica en la figura 4.

Figura 6. Inactivación del DNA lineal de $\phi 29$ por tratamiento con nitrosoguanidina.

Una solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ del DNA lineal de $\phi 29$ en Tris 0.05 M pH 7.5 en presencia de 1 mg/ml de nitrosoguanidina se incubó a 37°C con agitación suave. Las alícuotas tomadas a los tiempos que se indican se procesaron y la actividad del DNA se ensayó como se indica en la figura 4.

Figura 7. Desarrollo de fago e incorporación de timidina $-\text{H}^3$ en B. subtilis 110NA infectado con $\phi 29$ normal o con los mutantes ts 5(219) y ts 5(17).

B. subtilis 110NA su^- crecida en MJ (Métodos 19) se infectó con $\phi 29$ normal o con los mutantes ts 5(219) y ts 5(17) en presencia de timidina- H^3 a 42°C.

A.- A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar unidades formadoras de placa (Métodos 4). (—●—) $\phi 29$ normal; (—△—) ts 5(219); (—▲—) ts 5(17).

B.- A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14). Un cultivo sin infectar se llevó como control.

(—●—) Ø29 normal; (—Δ—) ts 5(219); (—▲—) ts 5(17); (—○—) células sin infectar.

Figura 8. Desarrollo de fago e incorporación de timidina -H³ en B. subtilis 110NA su⁻ infectada con Ø29 normal o con los mutantes sus 17(741), sus 17(112) o sus 1(629).

B. subtilis 110NA su⁻ crecida en MJ (Métodos 19) se infectó con Ø29 normal o con los mutantes sus 17(741), sus 17(112) o sus 1(629) en presencia de timidina-H³ a 42°C.

A.- A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa sobre B. subtilis MO-99 su⁺³ (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—Δ—) sus 17(741); (—▲—) sus 1(629); (—○—) sus 17(112).

B.- A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para determinar la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14). Un

cultivo sin infectar se llevó como control.

(—●—) Ø29 normal; (—Δ—)
sus 17(741); (—Δ—) sus 1(629); (—○—) sus
17(112); (—■—) células sin infectar.

Figura 9. Mapa genético de Ø29 obtenido por Moreno y col. (49).

Los mutantes entre paréntesis tienen un porcentaje de recombinación < 0.01 con respecto al mutante de referencia. Los mutantes entre corchetes están próximos al mutante de referencia (porcentaje de recombinación ≤ 0.2) pero su orden relativo no ha sido establecido.

Figura 10. Mapa genético parcial de Ø29. Cistrones 3 a 9.

La posición de los mutantes en este mapa está basada en los valores dados en la tabla V. Los valores indicados entre paréntesis o entre corchetes corresponden a los porcentajes de recombinación entre los mutantes que aparecen situados inmediatamente bajo ellos.

Figura 11. Mapa genético de $\phi 29$.

La posición de los mutantes en el mapa está basada en los porcentajes de recombinación obtenidos por Moreno y col. (49) y en los valores dados en la tabla V. Los mutantes separados por una coma presentan un porcentaje de recombinación < 0.01 con respecto al mutante de referencia. Los mutantes indicados entre corchetes están próximos al mutante de referencia (porcentaje de recombinación ≤ 0.1) pero su orden relativo no ha sido establecido.

Figura 12. Desarrollo de fago en B. subtilis su^- irradiado e infectado con $\phi 29$ normal o con los mutantes sus 15(212) o sus 12(47).

B. subtilis MO-101-P su^- se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 10.5 minutos y se infectó con el fago normal o con los mutantes sus 15(212) o sus 12(47). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) $\phi 29$ normal; (—○—) sus 12(47); (—▲—) sus 15(212).

Figura 13. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212), se marcó con leucina-C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina-H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 15(212); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 14. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212), se marcó con leucina-C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina-H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias

infectadas con el mutante sus 15(212); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 15. Radioactividad específica del mutante sus 15(212) en B. subtilis su⁻.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 15(212) que se muestran en la figura 14, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 16. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 12(47) o con ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 12(47), se marcó con leucina-C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina-H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(47); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con ø29 normal.

Figura 17. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el

mutante sus 12(47) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su^- irradiado e infectado con el mutante sus 12(47), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(47); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 18. Radioactividad específica del mutante sus 12(47) en B. subtilis su^- .

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 12(47) que se muestran en la figura 17, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 19. Desarrollo de fago en B. subtilis su^{+44} irradiado e infectado con $\phi 29$ normal o con los mutantes sus 15(212) o sus 12(47).

B. subtilis MO-101-P su^{+44} se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 9 minutos y se infectó con el fago normal o con los mutantes sus 15(212) o

sus 12(47). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—○—) sus 12 (47); (—▲—) sus 15(212).

Figura 20. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 15(212); (---○---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 21. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 15(212), se marcó con

leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 15(212); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 22. Radioactividad específica del mutante sus 15(212) en B. subtilis su⁺⁴⁴.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 15(212) que se muestran en la figura 21, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 23. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 12(47) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 12(47), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(47); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 24. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 12(47) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 12(47), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(47); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 25. Radioactividad específica del mutante sus 12(47) en B. subtilis su⁺⁴⁴.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 12(47) que se muestran en la figura 24, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 26. Desarrollo de fago en B. subtilis su^- irradiado e infectado con $\phi 29$ normal o con el mutante sus 12(610).

B. subtilis MO-101-P su^- se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 10.5 minutos y se infectó con el fago normal o con el mutante sus 12(610). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) $\phi 29$ normal; (—▲—) sus 12(610).

Figura 27. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^- irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o con $\phi 29$ normal.

B. subtilis MO-101-P su^- irradiado e infectado con el mutante sus 12(610), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(610); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con $\phi 29$ normal.

Figura 28. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^- irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su^- irradiado e infectado con el mutante sus 12(47), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(610); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 29. Radioactividad específica del mutante sus 12(610) en B. subtilis su^- .

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 12(610) que se muestran en la figura 28, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 30. Desarrollo de fago en B. subtilis su^{+44} irradiado e infectado con Ø29 normal o con el mutante sus 12(610).

B. subtilis MO-101-P su^{+44} se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 10.5 minutos y se

infectó con el fago normal o con el mutante sus 12 (610). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—▲—) sus 12 (610).

Figura 31. Desarrollo de fago en B. subtilis su⁺³ irradiado e infectado con Ø29 normal o con el mutante sus 12(610).

B. subtilis MO-99 su⁺³ se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 9 minutos y se infectó con el fago normal o con el mutante sus 12(610). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—▲—) sus 12 (610).

Figura 32. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-99 su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 12(610), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 25 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se

marcaron al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(610); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 33. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^{+3} irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o sin infectar.

B. subtilis MO-99 su^{+3} irradiado e infectado con el mutante sus 12(610), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 25 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(610); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 34. Radioactividad específica del mutante sus 12(610), en B. subtilis su^{+3} .

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 12(610) que se muestran en la figura 33, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97). -

Figura 35. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^{+44} irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su^{+44} irradiado e infectado con el mutante sus 12(610), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(610); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 36. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^{+44} irradiado e infectado con el mutante sus 12(610) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su^{+44} irradiado e infectado con el mutante sus 12(610), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 12(610); (---o---) radio-

actividad de bacterias sin infectar.

Figura 37. Radioactividad específica del mutante sus 12(610), en B. subtilis su^{+44} .

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 12(610) que se muestran en la figura 36, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 38. Desarrollo de fago en B. subtilis su^{-} irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22).

B. subtilis MO-101-P su^{-} se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 10.5 minutos y se infectó con el fago normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—○—) sus 8(22);
(—▲—) sus 8(769).

Figura 39. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^{-} irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su^{-} irradiado e infectado con el mutante sus 8(769), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la

infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron el mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(769); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 40. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(769); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 41. Radioactividad específica del mutante sus 8(769), en B. subtilis su⁻.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 8(769) que se

muestran en la figura 40, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 42. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—o—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(22); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 43. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su⁻ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10).

La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(22); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 44. Radioactividad específica del mutante sus 8(22) en B. subtilis su⁻.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 8(22) que se muestran en la figura 43 se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 45. Desarrollo de fago en B. subtilis su⁺³ irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22).

B. subtilis MO-99 su⁺³ se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 9 minutos y se infectó con el fago normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—o—) sus 8(22);
(—▲—) sus 8(769).

Figura 46. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^{+3} irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o con $\phi 29$ normal.

B. subtilis MO-99 su^{+3} irradiado e infectado con el mutante sus 8(769), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 40 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(769); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con $\phi 29$ normal.

Figura 47. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su^{+3} irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o sin infectar.

B. subtilis MO-99 su^{+3} irradiado e infectado con el mutante sus 8(769), se marcó con leucina $-C^{14}$ desde el minuto 15 al 40 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina $-H^3$ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(769); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 48. Radioactividad específica del mutante sus 8(769) en B. subtilis su⁺³.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 8(769) que se muestran en la figura 47, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 49. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o con ø29 normal.

B. subtilis MO-99 su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 40 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(22); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con ø29 normal.

Figura 50. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o sin infectar.

B. subtilis MO-99 su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 40 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(22); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 51. Radioactividad específica del mutante sus 8(22) en B. subtilis su⁺³.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 8(22) que se muestran en la figura 50, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 52. Desarrollo de fago en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22).

B. subtilis MO-101 su⁺⁴⁴ se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 9 minutos y se infectó con el fago normal o con los mutantes sus 8(769) o sus 8(22). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—○—) sus 8(22);
(—▲—) sus 8(769).

Figura 53. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(769); (---○---) radioactividad de bacterias infectadas con Ø29 normal.

Figura 54. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(769), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(769); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 55. Radioactividad específica del mutante sus 8(769) en B. subtilis su⁺⁴⁴.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 8(769) que se muestran en la figura 54, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 56. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o con Ø29 normal.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Bacterias infectadas con el fago normal se marcaron al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(22); (---o---) radioactividad de bacterias infectadas con ø29 normal.

Figura 57. Electroforesis de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22) o sin infectar.

B. subtilis MO-101-P su⁺⁴⁴ irradiado e infectado con el mutante sus 8(22), se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 60 después de la infección. Un cultivo de bacterias sin infectar se marcó al mismo tiempo con leucina -H³ (Métodos 10). La coelectroforesis se llevó a cabo como se describe en Métodos 12a.

(—●—) radioactividad de bacterias infectadas con el mutante sus 8(22); (---o---) radioactividad de bacterias sin infectar.

Figura 58. Radioactividad específica del mutante sus 8(22) en B. subtilis su⁺⁴⁴.

La radioactividad específica de las proteínas inducidas por el mutante sus 8(22) que se muestran en la figura 57, se calculó por el método de Mayol y Sinsheimer (97).

Figura 59. Desarrollo de fago en B. subtilis su⁺³ irradiado e infectado con Ø29 normal o con los mutantes sus 16(121) o sus 16(172).

B. subtilis MO-99 su⁺³ irradió con luz UV (Métodos 10) durante 9 minutos y se infectó con el fago normal o con los mutantes sus 16(121) o sus 16(172). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) Ø29 normal; (—○—) sus 16(121); (—■—) sus 16(172).

Figura 60. Densitometría de las proteínas inducidas en B. subtilis su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 16(121).

B. subtilis MO-99 su⁺³ irradiado e infectado con el mutante sus 16(121) o con el fago normal se marcó con leucina -C¹⁴ desde el minuto 15 al 35

después de la infección. Las células sin infectar se marcaron al mismo tiempo. La electroforesis en placa, la autorradiografía y la densitometría se realizaron como se describe en Métodos 12b. (A) células infectadas con $\phi 29$ normal. (B) células infectadas con el mutante sus 16(121). (C) células sin infectar.

Figura 61. Densitometría de las proteínas inducidas en B. subtilis su^{+3} irradiado e infectado con el mutante sus 16(172).

B. subtilis MO-99 su^{+33} se irradió y se infectó con el mutante sus 16(172) o con el fago normal, procediéndose en todo como se indica en la figura 60. (A) células infectadas con $\phi 29$ normal. (B) células infectadas con el mutante sus 16(172). (C) células sin infectar.

Figura 62. Desarrollo de fago en B. subtilis su^{-} irradiado e infectado con $\phi 29$ normal o con mutantes sus en el cistrón 8.

B. subtilis 110NA su^{-} se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 7.5 minutos y se infectó con el fago normal o con los mutantes sus en el cistrón 8 que se indican. A los tiempos indicados se tomaron

alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

A. (—●—) Ø29 normal; (—○—) sus 8(20011); (—■—) sus 8(50011); (—□—) sus 8(50012); (—▲—) sus 8(7221).

B. (—△—) sus 8(7222); (—▲—) sus 8(90011); (—○—) sus 8(22); (—●—) sus 8(71).

Figura 63. Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por mutantes sus en el cistron 8.

Diferentes cultivos de B. subtilis 110NA su⁻ irradiado (Métodos 10) se infectaron con los mutantes sus indicados y las proteínas inducidas se marcaron con leucina -C¹⁴ del minuto 28 al 35 después de la infección permitiéndose la incorporación de radioactividad durante 2 minutos adicionales en presencia de un exceso de 100 veces de leucina fría. Como control se marcó de igual manera un cultivo infectado con el fago normal y otro sin infectar. Las proteínas se precipitaron como se indica en Métodos 11b. La electroforesis en placa y la autorradiografía se realizaron como se describe en Métodos 12b.

Figura 64. Desarrollo de fago en B. subtilis su^- irradiado e infectado con $\phi 29$ normal o con los mutantes sus 7(614), sus A25, sus G10, sus H1 o el revertiente IV.

B. subtilis 110NA su^- se irradió con luz UV (Métodos 10) durante 7.5 minutos y se infectó con $\phi 29$ normal, con los mutantes sus que se indican, o con el revertiente IV del mutante sus 7(614). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar las unidades formadoras de placa (Métodos 4).

(—●—) $\phi 29$ normal; (—○—) sus 7(614);
(—▲—) sus A25; (—△—) sus G10; (—■—)
sus H1; (—□—) revertiente IV.

Figura 65. Autorradiografía de las proteínas inducidas en condiciones restrictivas por los mutantes sus 7(614), sus A25, sus G10, sus H1 y el revertiente IV.

Diferentes cultivos de B. subtilis 110NA irradiado (Métodos 10) se infectaron con los mutantes sus indicados o con el revertiente IV del mutante sus 7(614) y las proteínas inducidas se marcaron con leucina $-C^{14}$ del minuto 25 al 33 después de la infección en el caso del mutante sus 7(614) y del revertiente IV, y del minuto 30 al 38 después de la infección en el caso de los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1,

permitiéndose en todos los casos la incorporación de radioactividad durante 2 minutos adicionales en presencia de leucina fría. Como control se marcó de igual manera y del minuto 25 al 33 después de la infección, un cultivo infectado con el fago normal y otro sin infectar. Las proteínas se precipitaron como se indica en Métodos 11b. La electroforesis en placa y la autorradiografía se realizaron como se describe en Métodos 12b.

Figura 66. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus 14(1241).

B. subtilis 110NA su⁻ crecido en MJ (Métodos 24) se infectó con el mutante sus 14(1241) en presencia de hidrolizado de proteína -H³. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar unidades formadoras de placa (Métodos 4) y para determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14).

(—○—) unidades formadoras de placa;

(—●—) radioactividad incorporada.

Figura 67. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus A25.

B. subtilis 110NA su⁻ crecido en MJ (Métodos 24) se infectó con el mutante sus A25 en presencia de hidrolizado de proteína -C¹⁴. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar unidades formadoras de placa (Métodos 4) y para determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14).

(—○—) unidades formadoras de placa;
(—●—) radioactividad incorporada.

Figura 68. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus G10.

B. subtilis 110NA su⁻ crecido en MJ (Métodos 24) se infectó con el mutante sus G10 en presencia de hidrolizado de proteína -C¹⁴. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar unidades formadoras de placa (Métodos 4) y para determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14).

(—○—) unidades formadoras de placa;
(—●—) radioactividad incorporada.

Figura 69. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus H1.

B. subtilis 110NA su⁻ crecido en MJ (Métodos 24) se infectó con el mutante sus H1 en presencia de hidrolizado de proteína -C¹⁴. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar unidades formadoras de placa (Métodos 4) y para determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14).

(—○—) unidades formadoras de placa;
(—●—) radioactividad incorporada.

Figura 70. Desarrollo de fago e incorporación de radioactividad en B. subtilis su⁻ infectado con el revertiente IV del mutante sus 7(614).

B. subtilis 110NA su⁻ crecido en MJ (Métodos 24) se infectó con el revertiente IV del mutante sus 7(614) en presencia de hidrolizado de proteína -C¹⁴. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para valorar unidades formadoras de placa (Métodos 4) y para determinar radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14).

(—○—) unidades formadoras de placa;
(—●—) radioactividad incorporada.

Figura 71. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus 14(1241).

Un lisado de bacterias infectadas con el mutante sus 14(1241) y marcadas con hidrolizado de proteína -H³ (Métodos 24) se centrifugó en un gradiente de ClCs con 3 capas de densidades 1.1, 1.3 y 1.5 g cm³. Se tomó una alícuota de cada fracción del gradiente para determinar la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% (Métodos 14). En la figura se señalan las posiciones de las partículas de fago y de las cabezas vacías.

Figura 72. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus A25.

Un lisado de bacterias infectadas con el mutante sus A25 y marcadas con hidrolizado de proteína -C¹⁴ (Métodos 24) se procesó y centrifugó en un gradiente de ClCs por capas y se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción del gradiente como se indica en la figura 71. En la figura se señalan las posiciones de las partículas de fago y de las cabezas vacías.

Figura 73. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus G10.

Un lisado de bacterias infectadas con el mutante sus G10 y marcadas con hidrolizado de proteína -C¹⁴ (Métodos 24) se procesó y centrifugó en un gradiente de ClCs por capas y se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente cada fracción del gradiente como se indica en la Figura 71. En la figura se señalan las posiciones de las partículas de fago y de las cabezas vacías.

Figura 74. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el mutante sus H1.

Un lisado de bacterias infectadas con el mutante sus H1 y marcadas con hidrolizado de proteína -C¹⁴ (Métodos 24) se procesó y centrifugó en un gradiente de ClCs por capas y se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción del gradiente como se indica en la figura 71. En la figura se señalan las posiciones de las partículas de fago y de las cabezas vacías.

Figura 75. Gradiente de ClCs por capas de las partículas marcadas en B. subtilis 110NA su⁻ infectado con el revertiente IV del mutante sus 7(614).

Un lisado de bacterias infectadas con el revertiente IV del mutante sus 7(614) y marcadas con hidrolizado de proteína -C¹⁴ (Métodos 24) se procesó y centrifugó en un gradiente de ClCs por capas y se determinó la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción del gradiente como se indica en la figura 71. En la figura se señalan las posiciones de las partículas de fago y de las cabezas vacías.

Figura 76. Análisis por centrifugación en ClCs hasta equilibrio de las partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C¹⁴ en la proteína, se mezclaron con partículas de fago producidas en las mismas condiciones por el mutante sus 14(1241), marcadas con H³ en la proteína, llevadas como marcadores de la posición de las partículas de

fago normales y se sometieron a centrifugación en ClCs de densidad media 1.44 g/cm^3 (Métodos 25a). La radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C^{14} ; (---o---) partículas de fago marcadas con H^3 .

Figura 77. Análisis por centrifugación en ClCs hasta equilibrio de las partículas de fago producidas por el mutante sus A25 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus A25 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C^{14} en la proteína y las producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas condiciones, marcadas con H^3 en la proteína, se procesaron y centrifugaron en ClCs como se indica en la figura 76. La radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C^{14} ; (---o---) partículas de fago marcadas con H^3 .

Figura 78. Análisis por centrifugación en ClCs hasta equilibrio de las partículas de fago producidas por el mutante sus G10 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus G10 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C¹⁴ en la proteína y las producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas condiciones, marcadas con H³ en la proteína, se procesaron y centrifugaron en ClCs como se indica en la figura 76. La radioactividad insoluble en ácido tricloracético al 5% presente en cada fracción se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C¹⁴; (---o---) partículas de fago marcadas con H³.

Figura 79. Análisis por centrifugación en ClCs hasta equilibrio de las partículas de fago producidas por el mutante sus H1 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Partículas de fago producidas por el mutante sus H1 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C¹⁴ en la proteína y las producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas con H³ en la proteína, se

procesaron y centrifugaron en ClCs como se indica en la figura 76. La radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C^{14} ; (---o---) partículas de fago marcadas con H^3 .

Figura 80. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Partículas de fago producidas por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C^{14} en la proteína, se mezclaron con las partículas de fago producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas condiciones, marcadas con H^3 en la proteína y llevadas como marcadores de la posición de las partículas de fago normales y se sometieron a centrifugación en un gradiente preformado de sacarosa entre el 5 y el 20% (peso/volumen) (Métodos 25b). La radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción, se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C^{14} ; (---o---) partículas de fago marcadas con H^3 .

Figura 81. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el mutante sus A25 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Las partículas de fago producidas por el mutante sus A25 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C^{14} en la proteína, y las producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas condiciones, marcadas con H^3 en la proteína, se procesaron y centrifugaron en gradiente preformado de sacarosa del 5 al 20% como se indica en la figura 80. La radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción, se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C^{14} ; (---o---) partículas de fago marcadas con H^3 .

Figura 82. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el mutante sus G10 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Las partículas de fago producidas por el mutante sus G10 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C¹⁴ en la proteína, y las producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas condiciones, marcadas con H³ en la proteína, se procesaron y centrifugaron en gradiente preformado de sacarosa del 5 al 20% como se indica en la figura 80. La radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción, se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C¹⁴; (---o---) partículas de fago marcadas con H³.

Figura 83. Análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa de las partículas de fago producidas por el mutante sus H1 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

Las partículas de fago producidas por el mutante sus H1 en la infección de B. subtilis 110NA su⁻, marcadas con C¹⁴ en la proteína, y las producidas por el mutante sus 14(1241) en las mismas condiciones, marcadas con H³ en la proteína, se procesaron y centrifugaron en gradiente preformado de sacarosa del 5 al 20% como se indica en la figura 80.

La radioactividad insoluble en ácido tricloroacético al 5% presente en cada fracción, se determinó como se indica en Métodos 14.

(—●—) partículas de fago marcadas con C^{14} ; (---o---) partículas de fago marcadas con H^3 .

Figura 84. Autorradiografía de las proteínas presentes en las partículas de fago producidas en la infección de B. subtilis 110NA su^- por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1 y el revertiente IV del mutante sus 7(614).

Las proteínas presentes en las partículas de fago producidas por los mutantes indicados y por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su^- , marcadas con C^{14} (Métodos 24), se precipitaron en presencia de 30 μg de lisozima como se indica en Métodos 11b. Las proteínas presentes en las partículas producidas por el fago normal en las mismas condiciones, marcadas con S^{35} , y las proteínas inducidas por el fago normal en las mismas condiciones marcadas con leucina- C^{14} en un pulso de 5 a 13 minutos después de la infección (Métodos 10) se llevaron com control. La electroforesis en placa y la autorradiografía se realizaron como se describe en Métodos 12b.

Figura 85. Microscopia electrónica de las partículas de fago producidas por los mutantes sus A25, sus G10, sus H1, sus 14(1241) y el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻.

La partículas de fago producidas por los mutantes indicados y por el revertiente IV del mutante sus 7(614) en la infección de B. subtilis 110NA su⁻ se contrastaron por tinción negativa y se observaron al microscopio electrónico (Métodos 26b).

A. Micrografía electrónica representativa de las partículas de fago producidas por el mutante sus 14(1241) y por el revertiente IV del mutante sus 7(614) (300.000 aumentos).

B. Micrografía electrónica representativa de las partículas de fago sin fibras producidas por los mutantes sus A25, sus G10 y sus H1. (300.000 aumentos).

BIBLIOGRAFIA

1. Summers, W.C. y Siegel, R.B., *Nature* 223, 1111 (1969).
2. Chamberlin, M., McGrath, J. y Waskell, L., *Nature* 228, 227 (1970).
3. Dunn, J.J., Bautz, F.A. y Batuz, E.F.K., *Nature N.B.* 230, 94 (1971).
4. Maitra, U., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 443 (1971).
5. Pulitzer, J.F. y Geiduschek, E.P., *J. Mol. Biol.* 49, 489 (1970).
6. Szybalski, W., Boure, K., Fianot, M., Hayes, S., Hradecna, Z., Kumar, S., Lozeron, H.A., Nijkamp, H.J.J. y Stevens, W.F., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 341 (1970).
7. Champoux, J.J., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 319 (1970).
8. Herskowitz, I. y Signer, E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 355 (1970).
9. Casjens, S. y King, J., *Ann. Rev. Biochem.* 44, 555 (1975).
10. Studier, F.W., *J. Mol. Biol.* 11, 373 (1965).
11. Burgi, E. y Hersey, A.D., *Biophys. J.* 3, 309 (1963).
12. Rhoades, M., MacHattie, L.A. y Thomas, C.A., Jr., *J. Mol. Biol.* 37, 21 (1968).
13. Thomas, C.A. Jr. y MacHattie, L.A., *Ann. Rev. Biochem.* 36, 485 (1967).

14. Anderson, D.L., Hickman, D.D. y Reilly, B.E.,
J. Bacteriol. 91, 2081 (1966).
15. Anderson, E.L. y Moshafarra, E.T., J. Virol. 2,
1185 (1968).
16. Ortín, J., Viñuela, E., Salas, M. y Vázquez, C.,
Nature N.B. 234, 275 (1971).
17. Talavera, A. Comunicación personal.
18. Hirokawa, H., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69,
1555 (1972).
19. Chamberlin, M. y Berg, P., J. Mol. Biol. 8, 297
(1964).
20. Hayashi, M., Hayashi, M.N. y Spiegelman, S.,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 51, 351 (1964).
21. Geiduschek, E.P., Tocchini-Valentini, G.P. y
Sarnat, M.T., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52,
486 (1964).
22. Wood, W.B., Edgar, R.S., King, J., Lielansis, I.
y Henninger, M., Federation Proc., 27, 1160 (1968).
23. Levine, M., en "Current Topics in Microbiology
and Immunology", Ed. por Springer-Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York, 58, 135 (1972).
24. Campbell, A. en "The Bacteriophage Lambda", Ed.
por A.D. Hersey, p. 13, Cold Spring Harbor Labora-
tory (1971).
25. Viñuela, E., Méndez, E., Talavera, A., Ortín, J.
y Salas, M., FEBS Symp. 21, 195 (1970).
26. Méndez, E., Ramírez, G., Salas, M. y Viñuela, E.,
Virology 45, 567 (1971).

27. Ramírez, G. Méndez, E., Salas, M. y Viñuela, E.,
Virology 48, 263 (1972).
28. Salas, M., Vásquez, C., Méndez, E. y Viñuela, E.,
Virology 50, 180 (1972).
29. Hosoda, J. y Levintahl, C., Virology 34, 709 (1968).
30. McCorquodale, A.J., Oleson, A.E. y Buchanan, J.M.,
en "The Molecular Biology of Viruses", Ed. por J.
S. Corter y W. Paranchych, Academic Press, New
York (1967).
31. Studier, F.W. y Maizel, J.V.Jr., Virology 39, 575
(1969).
32. Hendrix, R.W. en "The Bacteriophage Lambda" Ed.
por A.D. Hersey, p. 355, Cold Spring Harbor Labora-
tory (1971).
33. Pthasne, M., Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 306 (1967).
34. Burgess, A.B. y Denhart, D.T., J. Mol. Biol. 44,
377 (1969).
35. Gelfand, D.H. y Hayashi, M., J. Mol. Biol. 44,
501 (1969).
36. Carrascosa, J.L., Viñuela, E. and Salas, M.,
Virology 56, 291 (1973).
37. Hawley, L.A., Reilly, B.E., Hagen, E.H. y Ander-
son, D.L., J. Virol. 12, 1149 (1973).
38. McGuire, J.C., Pène, J.J. y Barrow-Carraway, J.,
J. Virol. 13, 690 (1974).
39. Carrascosa, J.L., Camacho, A., Moreno, F., Jiménez,
F., Mellado, R.P., Viñuela, E. y Salas, M. Eur.
J. Biochem. En prensa.

40. Anderson, D.L. y Reilly, B.E., J. Virol. 13, 211 (1974).
41. Carrascosa, J.L., Camacho, A., Viñuela, E. y Salas, M., Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 44, 317 (1974).
42. Talavera, A., Jiménez, F., Salas, M. y Viñuela, E., Virology 46, 586 (1971).
43. Hagen, E.W., Zeece, V. M. y Anderson D.L., Virology 43, 561 (1971).
44. Okubo, S. y Yanagida, T., J. Bacteriol. 95, 1187 (1968).
45. Georgopoulos, C.P., J. Bacteriol. 97, 1397 (1969).
46. Hoch, J.A., J. Bacteriol. 105, 896 (1971).
47. Camacho, A., Moreno, F., Carrascosa, J.L., Viñuela, E. y Salas, M., Eur. J. Biochem. 47, 199 (1974).
48. Shub, D.A., J. Bacteriol. 122, 788 (1975).
49. Moreno, F., Camacho, A., Viñuela, E. y Salas, M., Virology 62, 1 (1974).
50. Reilly, B.E., Zeece, V.M. y Anderson, D.L., J. Virol. 11, 756 (1973).
51. Anderson, D.L. y Reilly, B.E., J. Virol. 13, 211 (1974).
52. Garen, A., Garen, S. y Wilhelm, R.C., J. Mol. Biol. 14, 167 (1965).
53. Galluci, E. y Garen, A., J. Mol. Biol. 15, 193 (1966).
54. Sambrook, J.F., Farr, D.P. y Brenner, S., Nature 214, 452 (1967).

55. Brenner, S., Stretton, A.O.W. y Kaplan, S.,
Nature 206, 994 (1965).
56. Brenner, S., Barnett, E.R., Katz, F.H. y Crick,
F.H.C., Nature 213, 449 (1967).
57. Weigert, M.G. y Garen, A., Nature 206, 992 (1965).
58. Crick, F.H.C., J. Mol. Biol. 19, 548 (1966).
59. Brenner, S. y Beckwith, J.R., J. Mol. Biol. 13,
629 (1965).
60. Engelhardt, D.L., Webster, R.E., Wilhelm, R.C.
y Zinder, N.D., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 54,
1791 (1965).
61. Garen, A., Science. 160, 149 (1968).
62. Weigert, M.G. y Garen, A., J. Mol. Biol. 12, 448
(1965).
63. Weigert, M.G., Lanka, E. y Garen, A., J. Mol. Biol.
14, 552 (1965).
64. Kaplan, S., Stretton, A.O.W. y Brenner, S., J.
Mol. Biol. 14, 528 (1965).
65. Weigert, M.G., Lanka, E. y Garen, A., J. Mol. Biol.
23, 401 (1967).
66. Van Montagu, M., Leurs, C., Brachet, P. y Thomas,
R., Mut. Res. 4, 698 (1967).
67. Thomas, R., Leurs, C., Dambly, C., Parmentier, D.,
Lambert, L., Brachet, P., Lefebvre, N., Mousset,
S., Porcheret, J., Szpirer, J. y Wauters, D., Mut.
Res. 4, 735 (1967).
68. Inciarte, M.R. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias
Biológicas. Universidad Complutense de Madrid (1975).

69. Michel, J.F. y Cami, B., Ann. Inst. Pasteur 116, 3 (1969).
70. Anagnostopoulos, C. y Spizizen, J., J. Bacteriol. 81, 741 (1961).
71. Dubnan, D., Goldwaite, C., Smith, J. y Marmur, J., J. Mol. Biol. 27, 163 (1967).
72. Coleman, G., Biochem. J. 112, 533 (1969).
73. Anagnostopoulos, C. y Spizizen, J., J. Bacteriol. 91, 2071 (1966).
74. Adams, M.H., "Bacteriophages" (1959). Wiley-Interscience, New York.
75. Meistrich, M.L. y Drake, J.W., J. Mol. Biol. 66, 107 (1972).
76. Osborn, M., Person, S., Phillips, S. y Funk, F., J. Mol. Biol. 26, 437 (1967).
77. Laemmli, U.K., Nature 227, 680 (1970).
78. Fairbanks, G., Levinthal, C. y Reeder, R.H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 393 (1965).
79. Loening, U.E., Biochem. J. 102, 251 (1967).
80. Cerdá-Olmedo, E., Hanawalt, P.C. y Guerola, N., J. Mol. Biol. 33, 70 (1968).
81. Lewis, E.B., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16, 159 (1961).
82. Benzer, S. en "The Chemical Basis of Heredity" Ed. por McElroy, W.D. y Glass, B., p. 70, Baltimore, John Hopkins Press (1957).

83. Talavera, A., Salas, M. y Viñuela, E., Eur. J. Biochem. 31, 367 (1972).
84. Schachtele, C.F., Reilly, B.E., De Sain, C.V., Whittington, M.D. y Anderson, D.L., J. Virol. 11, 153 (1973).
85. Gass, K.B., Low, R.L. y Cozzarelli, N.R., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 103 (1973).
86. MacKenzie, J.M., Neville, M.M., Wright, G.E. y Brown, N.C., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 512 (1973).
87. Bott, K.F. y Wilson, G.A., J. Bacteriol. 94, 562 (1967).
88. Bott, K.F. y Wilson, G.A., Bacteriol. Rev. 32, 370 (1968).
89. Strack, H.B., Freese, E.B. y Freese, E., Mut. Res. 1, 10 (1964).
90. Freese, E.B. y Freese, E., Genetics 52, 1289 (1964).
91. La Polla, J.P., Harris, C.M. y Vary, J.C., Biochem, Biophys. Res. Commun. 49, 133 (1972).
92. Camacho, A., Jiménez, F., de la Torre, J., Carrascosa, J.L., Mellado, R.P., Vázquez, C., Viñuela, E., y Salas, M. Enviado a Eur. J. Biochem.
93. Eisenstark, A., Methods in Virology, 1, 450 (1966).
94. Studier, F.W., Virology 39, 562 (1969).
95. Reilly, B.E. Comunicación personal.
96. Carrascosa, J.L. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid (1975).

97. Mayol, R.F. y Sinsheimer, R.L., J. Virol. 6, 310 (1970).
98. Camacho, A. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid (1975).
99. Carrascosa, J.L. Resultados no publicados.
100. Talavera, A., Jiménez, F., Salas, M. y Viñuela, E., Mol. Gen. Genet. 115, 31 (1972).
101. Parkinson, J.S. Genetics 59, 311 (1968).
102. MacKinlay, A.G., y Kaiser, A.D., J. Mol. Biol. 39, 679 (1969).
103. Mount, D.W.A., Harris, A.W., Fuerst, C.R. y Siminovitch, L., Virology 35, 134 (1968).
104. Eiserling, F.A. y Dickson, R.C., Ann. Rev. Biochem. 41, 467 (1972).
105. Showe, M. y Black, L., Nature N.B. 242, 70 (1973).
106. Botstein, D., Wadwell, C.H. y King, J., J. Mol. Biol. 80, 669 (1973).
107. Viñuela, E., Camacho, A., Jiménez, F., Carrascosa, J.L., Ramírez, G. y Salas, M., Proc. Royal Soc. (London). En prensa.
108. Schachtele, C.F., De Sain, C.V. y Anderson, D.L., J. Virol. 11, 9 (1973).
109. Hendrix, R.W. y Casjens, S.R., Virology 61, 156 (1974).
110. Jacobson, J.F., Asso, J. y Baltimore, D., J. Mol. Biol. 49, 657 (1970).